

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 14/00, A61K 39/00, C12N 15/00</b>		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/55192</b>
		<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 21. September 2000 (21.09.00)	
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/02410		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 17. März 2000 (17.03.00)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 11 971.6 17. März 1999 (17.03.99) DE 199 39 578.0 20. August 1999 (20.08.99) DE			
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Schorndorfer Strasse 32, D-70734 Fellbach (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b>			
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> MARKL, Jürgen [DE/DE]; An der Mahlsteig 12, D-55296 Gau-Bischofsheim (DE). ALTENHEIN, Benjamin [DE/DE]; Elsässer Platz 7, D-65195 Wiesbaden (DE). LIEB, Bernhard [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Strasse 27, D-55129 Mainz (DE). STIEFEL, Thomas [DE/DE]; Steinkopfstrasse 22, D-70184 Stuttgart (DE).		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(74) Anwalt:</b> GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).			
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID MOLECULE COMPRISING A NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR A HEMOCYANIN			
<b>(54) Bezeichnung:</b> NUKLEINSÄUREMOLEKÜL, UMFASSEND EINE FÜR EIN HÄMOCYANIN KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ			
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence coding for a hemocyanin, a hemocyanin domain or a fragment having the immunological properties of at least one hemocyanin domain. The invention also relates to constructs containing the nucleic acid molecule and possibly a promoter suitable for controlling expression. According to a preferred embodiment the construct also contains a nucleic acid sequence coding for an antigen. The invention also relates to host cells containing the above nucleic acid molecules and/or constructs, to the recombinant expression of the nucleic acid molecules and/or constructs in the host cells, as well as to hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment having the immunological properties of at least one hemocyanin domain and hemocyanin fusion proteins which are coded for by the nucleic acid molecules and/or constructs. The invention also relates to pharmaceutical preparations containing the nucleic acid molecules and/or hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, and to liposomes containing the nucleic acid molecules and/or hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein. Finally the invention relates to antibodies which can be obtained by immunization of an experimental animal with the hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, as well to their use in screening methods for identifying tumors.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Konstrukte, die das Nukleinsäuremolekül und gegebenenfalls einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Konstrukt ferner eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz. Die Erfindung betrifft ausserdem Wirtszellen, die diese Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die rekombinante Expression der Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte in den Wirtszellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin und Hämocyanin-Fusionsproteine, die von den Nukleinsäuremolekülen und/oder Konstrukten kodiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung Liposomen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Hämocyanin, einer Hämocyanin-Domäne, einem Fragment davon oder einem Fusionsprotein, erhältlich sind, und deren Verwendung in Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumoren.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz, diese umfassende Konstrukte, die Nukleinsäuresequenzen oder die Konstrukte umfassende Wirtszellen, Verfahren zum Herstellen von Hämocyanin-Polypeptiden und rekombinante Hämocyanin-Polypeptide.

Hämocyanin ist ein blaues Kupferprotein, das frei gelöst im Blut zahlreicher Mollusken und Arthropoden auftritt und den Sauerstoff transportiert. Von den Mollusken enthalten die Cephalopoden, Chitonen, die meisten Gastropoden sowie einige Bivalvia Hämocyanin. Hämocyanin ist bei den Arthropoden typisch für Arachniden, Xiphosuren, malakostroke Crustaceen und *Scutigera*. Zahlreiche Insektenarten weisen Proteine auf, die sich von Hämocyanin ableiten. Hämocyanine liegen extrazellulär vor und flottieren in der Hämolymphe.

Während das Arthropoden-Hämocyanin bei elektronenmikroskopischer Untersuchung einen Durchmesser von maximal 25 nm hat und eine Untereinheit ein Molekulargewicht von 75.000 Da aufweist, sind Molluskencyanine viel größer. So hat z.B. das Hämocyanin von *Megathura* einen Durchmesser von 35 nm und ist aus 2 Untereinheiten zusammengesetzt. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 400.000 Da und ist in acht sauerstoffbindende Domänen aufgeteilt, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 50.000 Da haben. Die Domänen unterscheiden sich immunologisch. Diese Domänen können durch limitierte Proteolyse aus der Untereinheit freigesetzt werden.

Das im Elektronenmikroskop sichtbare Hämocyanin der Gastropoden hat ein Molekulargewicht von ca. 8 Mio. Da und ist ein Di-Dekamer. Im Gegensatz hierzu ist das Hämocyanin der Cephalopoden als isoliertes Dekamer angeordnet, das sich auch in der Quartärstruktur deutlich vom Hämocyanin der Gastropoden unterscheidet.

Von besonderem immunologischen Interesse ist das Hämocyanin der kalifornischen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*, einer „Keyhole Limpet“. Das Hämocyanin wird deshalb auch als Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) bezeichnet. Hämocyanine sind sehr starke Antigene. Die Immunisierung eines Vertebraten führt zu einer bisher wenig verstandenen, unspezifischen Aktivierung des Immunsystems. Durch die allgemeine Aktivierung des Immunsystems ist es dann möglich, auch eine Immunreaktion gegenüber anderen, bisher tolerierten Fremdstrukturen zu erreichen. KLH wird vor allem als Hapten-Träger verwendet, um so die Bildung von Antikörpern gegen das Hapten zu erreichen.

Neben *Megathura crenulata* gehört auch das Seeohr *Haliotis tuberculata* zur im Hinblick auf die Evolution relativ alten Gruppe der Archagastropoda. Es ist bekannt, daß auch *Haliotis* Hämocyanin produziert.

KLH ist ein Gemisch aus zwei unterschiedlichen Hämocyaninen, die als KLH1 und KLH2 bezeichnet werden. Die Untereinheit des KLH1 ist ein 390 kDa Polypeptid, das aus acht globulären Domänen besteht, die entsprechend ihrer Reihenfolge in der Untereinheit mit 1 a bis 1 h bezeichnet werden. KLH2 hingegen weist ein Molekulargewicht von 350 kDa auf und enthält nach neuesten Daten ebenfalls 8 Domänen, die als 2 a bis 2 h bezeichnet werden. *In vivo* bildet jede Art von Untereinheit Homo-Oligomere, wohingegen Hetero-Oligomere nicht beobachtet wurden.

Durch limitierte Proteolyse und gekreuzte Immunelektrophorese der Untereinheit von KLH1 und KLH2 wurden amino-, interne und carboxy-terminale Domänen erhalten, deren amino-terminale Sequenz bestimmt wurde (Söhngen et al., Eur. J. Biochem. 248 (1997), 602-614; Gebauer et al., Zoology 98(1994), 51-68). Die erhaltenen Sequenzen erlauben jedoch nicht den Entwurf sequenzspezifischer Primer und/oder Sonden, die für eine Hybridisierung mit genomischer DNA Erfolg versprechen. Obwohl beide KLH-Typen seit 1991 bzw. 1994 bekannt sind, konnte daher bisher keine Primärstruktur aufgeklärt werden.

Auf DNA-Ebene ist bisher in bezug auf Mollusken nur die cDNA-Sequenz der Hämocyanin-Untereinheit aus dem Cephalopoden *Octopus dofleini* bekannt (Miller et al., J. Mol.

Biol. 278 (1998), 827-842). *Octopus doffeini* ist phylogenetisch von den Archæogastropoden sehr weit entfernt. Eine Hämocyanin-Gensequenz aus Mollusken ist bisher überhaupt nicht bekannt.

Wie von Miller et al. supra, beschrieben, ist es sowohl schwierig, eine einzige funktionelle Domäne (Funktionelle Einheit = Domäne; auch „funktionelle Domäne“ genannt) zu isolieren als auch Gewebe zu erhalten, das zur Aufreinigung von mRNA für die cDNA-Sequenzierung geeignet ist.

Bei der Analyse des Hämocyanins aus *Megathura crenulata* besteht eine weitere Schwierigkeit darin, daß die Versuchstiere ein Alter von 4 bis 8 Jahren erreicht haben müssen, um ihnen erstmals Hämolymphe entnehmen zu können. Nach Entnahme der Hämolymphe wird Hämocyanin bei diesen Tieren nicht nachproduziert. Bisher ist nicht bekannt, wie die Hämocyaninsynthese stimuliert werden könnte. Darüber hinaus ist die Zucht von *Megathura* äußerst aufwendig, da hierfür spezielle Strömungsbecken erforderlich sind.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel und Wege bereitzustellen, um Hämocyanin und/oder Domänen davon in ausreichender Menge und kostengünstig produzieren zu können. Dies umfaßt die weitere Aufgabe, ein Verfahren anzugeben, mit dem dieses Hämocyanin hergestellt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus

- (a) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne b),  
SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne c),  
SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne d),  
SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne e),  
SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne g),  
SEQ ID NO: 8 (HtH1 Domäne h),  
SEQ ID NO:9 (partielle HtH2 Domäne b),  
SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne c),  
SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne d),  
SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:15 (HtH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:16 (partielle KLH1 Domäne b),  
SEQ ID NO:17 (KLH1 Domäne c),  
SEQ ID NO:18 (KLH1 Domäne d),  
SEQ ID NO:19 (partielle KLH1 Domäne e),  
SEQ ID NO:20 (KLH2 Domäne b),  
SEQ ID NO:21 (KLH2 Domäne c),  
SEQ ID NO:22 (partielle KLH2 Domäne d),  
SEQ ID NO:23 (KLH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:24 (partielle KLH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:49 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:50 (partielle HtH2 Domäne a),  
SEQ ID NO:51 (HtH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:52 (HtH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:53 (HtH2 Domäne e'),  
SEQ ID NO:54 (KLH1 Domäne e'),  
SEQ ID NO:55 (KLH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:56 (KLH1 Domäne g),  
SEQ ID NO:57 (KLH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:58 (KLH2 Domäne c'),

SEQ ID NO:59 (KLH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:60 (KLH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:61 (KLH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:62 (KLH2 Domäne g'),  
SEQ ID NO:80 (HtH1 Domäne a" + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:81 (HtH1 Domäne b"),  
SEQ ID NO:82 (HtH1 Domäne c"),  
SEQ ID NO:83 (HtH1 Domäne d"),  
SEQ ID NO:84 (HtH1 Domäne e"),  
SEQ ID NO:85 (HtH1 Domäne f"),  
SEQ ID NO:86 (HtH1 Domäne g"),  
SEQ ID NO:87 (HtH1 Domäne h"),  
SEQ ID NO:88 (partielle HtH2 Domäne a"),  
SEQ ID NO:89 (HtH2 Domäne b"),  
SEQ ID NO:90 (HtH2 Domäne c"),  
SEQ ID NO:91 (HtH2 Domäne d"),  
SEQ ID NO:92 (HtH2 Domäne e"),  
SEQ ID NO:93 (HtH2 Domäne f"),  
SEQ ID NO:94 (HtH2 Domäne g"),  
SEQ ID NO:95 (HtH2 Domäne h"),  
SEQ ID NO:96 (partielle KLH1 Domäne b"),  
SEQ ID NO:97 (KLH1 Domäne c"),  
SEQ ID NO:98 (KLH1 Domäne d"),  
SEQ ID NO:99 (KLH1 Domäne e"),  
SEQ ID NO:100 (KLH1 Domäne f"),  
SEQ ID NO:101 (KLH1 Domäne g"),  
SEQ ID NO:102 (KLH2 Domäne b"),  
SEQ ID NO:103 (KLH2 Domäne c"),  
SEQ ID NO:104 (KLH2 Domäne d"),  
SEQ ID NO:105 (KLH2 Domäne e"),  
SEQ ID NO:106 (KLH2 Domäne f"),  
SEQ ID NO:107 (KLH2 Domäne g"),  
SEQ ID NO:108 (partielle KLH2 Domäne h"),

- (b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) Varianten der unter (a) bis (e) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist; und
- (g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

Im nachfolgenden werden einige Begriffe näher erläutert, um klarzustellen, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Anmeldung verstanden werden sollen.

Der Begriff "Hämocyanin", so, wie er nachfolgend in der Beschreibung verwendet wird, umfaßt vollständiges Hämocyanin, Hämocyanin-Domänen und/oder Fragmente, Hämocyanin-Mutanten und Fusionsproteine. In bezug auf die Fusionsproteine sind insbesondere solche umfaßt, bei denen die Fusion Hämocyanin und Antigene umfaßt.



Unter „Domänen“ werden funktionelle Teilsequenzen der Hämocyanin-Untereinheiten verstanden, die beispielsweise durch limitierte Proteolyse voneinander abgetrennt werden können. Weiterhin können sie unterschiedliche immunologische Eigenschaften aufweisen.

Mit den „immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin“ ist die Eigenschaft eines Polypeptids gemeint, in gleicher Weise wie wenigstens eine Domäne von Hämocyanin eine immunologische Antwort des Empfängers zu induzieren, der mit dem Polypeptid immunisiert wird. Unter „immunologischer Antwort“ werden hier T- und/oder B-Zell-Antworten gegen Hämocyanin-Epitope verstanden, wie beispielsweise eine Antikörperproduktion. Die immunologische Reaktion kann beispielsweise beobachtet werden durch Immunisieren eines Säugers, wie z.B. einer Maus, einer Ratte oder eines Kaninchens mit dem entsprechenden Polypeptid und Vergleich der Immunantwort auf das zur Immunisierung verwendete Polypeptid mit der Immunantwort auf natürliche Hämocyanine.

Der Begriff "Antigen" umfaßt erfindungsgemäß sowohl Haptene, als auch schwache und starke Antigene. Haptene sind dadurch charakterisiert, daß sie Substanzen niedriger Molekülmasse (kleiner als 4000 Da) sind, jedoch ohne Kopplung an ein Trägermolekül nicht in der Lage sind, eine immunologische Reaktion auszulösen. Schwache Antigene sind Substanzen, die selbst bereits eine immunologische Reaktion auslösen können, deren Potential, eine immunologische Reaktion auslösen zu können, durch Kopplung mit einem Träger-Molekül auf Protein- und/oder DNA-Ebene, noch erhöht werden kann.

"His-Tag" bedeutet eine Sequenz von wenigstens 6 Histidin-Aminosäuren, die durch entsprechende Klonierung und Fusion mit einer exprimierbaren Sequenz zu einem Fusionsprotein mit wenigstens 6 His-Resten am NH<sub>2</sub>-Terminus führt, das leicht durch Komplexierung mit einer Ni<sup>2+</sup>-Säule aufgereinigt werden kann.

"Klonierung" soll alle im Stand der Technik bekannten Klonierungsmethoden umfassen, die hier zum Einsatz kommen könnten, die jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

„Varianten“ einer Nukleinsäure umfassen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen und kodieren für ein Polypeptid, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist. Varianten können künstlich oder natürlich sein. Ein Beispiel für natürliche Varianten stellen allelische Varianten dar.

Unter "rekombinanter Expression in einer geeigneten Wirtszelle" sollen alle im Stand der Technik bekannten Expressionsmethoden in bekannten Expressionssystemen verstanden werden, die hier zum Einsatz kommen könnten, jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleinsäuresequenz kann genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten. Weiter kann es sich bei den Nukleinsäuresequenzen um RNA-Sequenzen handeln, was z.B. für die Expression mittels rekombinanter Vektorsysteme erforderlich sein kann. Die Nukleinsäuresequenzen gemäß (b) sind beispielsweise erhältlich durch Verwenden einer nachweisbar markierten Sonde, die einer der unter (a) angegebenen Sequenzen oder einem Fragment bzw. deren Gegenstrang entspricht, zum Screening von cDNA-/genomischen DNA-Bibliotheken aus Mollusken oder Arthropoden. Die der cDNA-Bibliothek zugrundeliegende mRNA ist vorzugsweise aus Mollusken-Gewebe zu erhalten, die Hämocyanin besonders stark exprimieren, wie z.B. Mantel-Gewebe aus Gastropoden und Branchialdrüsengewebe aus Cephalopoden.

Die Identifizierung positiver cDNA-/genomischer DNA-Klone erfolgt gemäß Standardverfahren. Vgl. Maniatis et al., Molecular Cloning (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind z.B. 68°C über Nacht in 0,5 x SSC; 1% Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim); 0,1 % Natriumlaurylsarcosinat und nachfolgendem Waschen mit 2 x SSC; 0,1 % SDS.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuresequenzen bereitgestellt, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind. Bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 80% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Besonders bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 95% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.

Erfindungsgemäß bedeutet der Ausdruck „Homologie“ Homologie auf DNA-Ebene, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck „Homologie“ bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Nukleinsäuremolekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der „Homologie“ ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Die Homologie miteinander verwandter Nukleinsäuremoleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt.

Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Auch der be-

kannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Homologien verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Nukleinsäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)		
Vergleichsmatrix:	Übereinstimmung (matches)	= + 10	
	Nichtübereinstimmung (mismatch)	= 0	
Lücken-Wert (Gap Penalty):	50		
Lückenzahlen-Wert: (Gap Length Penalty):	3		

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Fehler-Parameter (default parameters) für Nukleinsäuresequenz-Vergleiche.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60 % wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60 % Homologie bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Homologiegrade.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eine Kombination mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen, die durch dem Fachmann bekannte Fusion und gegebenenfalls Klonierung erhalten werden können. Diese Kombination sind von besonderem Interesse, da sie besonders immunogen

sind. Insbesondere sind Kombinationen bevorzugt, die mehrere oder alle Domänen in der in der Untereinheit natürlicherweise vorkommenden Reihenfolge (a bis h) aufweisen. Besonders bevorzugt sind dabei Ausführungsformen, in denen die für die Domänen kodierenden Nukleinsäuresequenzen direkt im Raster aneinandergeschlüsselt sind.

Weiterhin werden Konstrukte bereitgestellt, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Konstrukt einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht. Die Wahl des Promotors hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind konstitutive Promotoren bevorzugt, jedoch sind auch induzierbare Promotoren wie z.B. der Metallothionein-Promotor möglich.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt ferner eine Antigen-kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der erfindungsgemäßen Hämocyanin-Nukleinsäure verbunden ist. Die Antigen-kodierende Sequenz kann sowohl 5' als auch 3' relativ zur Hämocyanin-Sequenz oder auch an beiden Enden gelegen sein. Sie schließt im gleichen Leseraster entweder unmittelbar an die Hämocyanin-Sequenz an oder ist durch einen Nukleinsäure-Linker unter Wahrung des Leserasters mit ihr verbunden. Durch die Fusion der Antigen-kodierenden Sequenz mit der Hämocyanin-Sequenz ist die Bildung eines Fusionsproteins beabsichtigt, in dem die Antigen-kodierende Sequenz kovalent mit der Hämocyanin-Sequenz verbunden ist. Das erfindungsgemäße Antigen ist hierbei ein medizinisch relevantes Antigen, das beispielsweise ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene. Tumorantigene können hierbei beispielsweise Rb und p53 sein. Vorzugsweise stammen die Virusantigene aus immunologisch relevanten Viren, wie z.B. Influenza-Virus, Hepatitis-Virus und HIV. Pathogenantigene sind unter anderem solche aus Säugerpathogenen, insbesondere humanpathogenen Organismen, wie z.B. Plasmodium. Bakterielle Antigene können z.B. von *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia*, *Streptococci* oder *Staphylococci* stammen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt ferner wenigstens ein Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Regionen, wobei der Vektor ausge-

wählt ist aus : Bacteriophagen wie  $\lambda$ -Derivaten, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Viren und Retroviren, vorzugsweise MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

Ferner ist ein Konstrukt bevorzugt, das zusätzlich eine His-Tag-kodierende DNA-Sequenz umfaßt, die bei Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag am NH<sub>2</sub>-Terminus des Hämocyanins führt, welches die Aufreinigung des Proteins an einer Nickel-Säule durch Chelat-Bildung erleichtert.

Ferner stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die das Konstrukt enthalten und die zur Expression des Konstruktes geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z.B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung Glykosylierungs-defizienter oder Glykosylierungs-verringelter Wirtszellen erhaltenen Hämocyanine verfügen möglicherweise über zusätzliche Epitope, die bei vollständiger Glykosylierung ansonsten dem Immunsystem des Empfängers nicht zugänglich sind, so daß Hämocyanine mit verringerter Glykosylierung unter Umständen eine erhöhte Immunogenizität aufweisen. Aus mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Pflanzenzellen können transgene Pflanzen oder Pflanzenzellkulturen hergestellt werden, die Hämocyanin-Polypeptide produzieren, beispielsweise Tabak-, Kartoffel-, Tomaten-, Zuckerrüben-, Sojabohnen-, Kaffee-, Erbsen-, Bohnen-, Raps-, Baumwoll-, Reis- oder Maispflanzen bzw. -pflanzenzellkulturen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiter ein Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptids. Dazu wird das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder das Konstrukt in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Protein aus der Wirtszelle oder dem Medium mittels üblicher Verfahren isoliert.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Expression von DNA-Sequenzen bekannt; vergleiche Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular

Biology, Band 62, Humana Press Totowa New Jersey (1995). Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein, wobei Induktoren wie beispielsweise IPTG und  $\text{Zn}^{2+}$  dem Fachmann bekannt sind. Das hergestellte Hämocyanin kann, falls ein His-Tag an den  $\text{NH}_2$ -Terminus des Hämocyanin fusioniert wurde, durch Chelat-Bildung an einer Nickel-Säule aufgereinigt werden. Verfahren zum Aufreinigen von Hämocyanin, insbesondere KLH, finden sich in Harris et al., Micron 26 (1995), 201-212. Vorzugsweise wird das Hämocyanin durch Ionenaustausch-Chromatographie und/oder Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die Durchführung dieser Maßnahmen ist dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäß hergestellte Hämocyanin modifiziert. Die Modifikationen umfassen hierbei die Di-, Oligo- und Polymerisierung des monomeren Ausgangsprodukts beispielsweise durch Quervernetzung, z.B. durch Dicyclohexylcarbodiimid oder Pegylierung oder Assoziation (self assembly). Die somit hergestellten Di-, Oligo- und Polymere können voneinander durch Gelfiltration abgetrennt werden. Insbesondere beabsichtigt ist die Bildung von Dekameren, Didekameren oder Multi-Dekameren. Weitere Modifikationen umfassen Seitenketten-Modifikationen, beispielsweise von  $\epsilon$ -Amino-Lysin-Resten des Hämocyanins, oder Amino- bzw. Carboxy-terminale Modifikationen. Besonders bevorzugt ist die Modifikation des Hämocyanins durch kovalente Bindung an ein Antigen, wobei das Antigen stöchiometrisch oder nicht-stöchiometrisch mit dem Hämocyanin umgesetzt sein kann. Das Antigen ist vorzugsweise ausgewählt aus Tumorantigenen, Virusantigenen und Pathogenantigenen wie oben ausgeführt. Weitere Modifikationen umfassen posttranslationale Ereignisse, z.B. die Glykosylierung oder die partielle oder vollständige Deglykosylierung des Proteins.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erhaltene Hämocyanin bei rekombinanter Expression in Prokaryonten oder Glykosylierungs-defizienten Eukaryonten nicht-glykosyliert. Ebenfalls in Betracht gezogen wird erfindungsgemäß Hämocyanin, das durch rekombinante Expression in zur Glykosylierung fähigen Eukaryonten wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugerzellen, wie CHO-Zellen oder HeLa-Zellen, glykosyliert ist.

In einer weiteren Ausführungsform werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die eine Aminosäuresequenz umfassen, wobei die Aminosäuresequenz von einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodiert wird.

Bevorzugt werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz umfassen:

SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne b),  
SEQ ID NO:27 (HtH1 Domäne c),  
SEQ ID NO:28 (HtH1 Domäne d),  
SEQ ID NO:29 (HtH1 Domäne e),  
SEQ ID NO:30 (HtH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:31 (HtH1 Domäne g),  
SEQ ID NO:32 (HtH1 Domäne h),  
SEQ ID NO:33 (partielle HtH2 Domäne b),  
SEQ ID NO:34 (HtH2 Domäne c),  
SEQ ID NO:35 (HtH2 Domäne d),  
SEQ ID NO:36 (HtH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:37 (HtH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:38 (HtH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:39 (HtH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:40 (partielle KLH1 Domäne b),  
SEQ ID NO:41 (KLH1 Domäne c),  
SEQ ID NO:42 (partielle KLH1 Domäne d),  
SEQ ID NO:43 (partielle KLH1 Domäne e),  
SEQ ID NO:44 (KLH2 Domäne b),  
SEQ ID NO:45 (KLH2 Domäne c),  
SEQ ID NO:46 (partielle KLH2 Domäne d),  
SEQ ID NO:47 (KLH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:48 (partielle KLH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:63 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:64 (HtH1 Domäne h'),



SEQ ID NO:65 (partielle HtH2 Domäne a)  
SEQ ID NO:66 (HtH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:67 (HtH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:68 (HtH2 Domäne e'),  
SEQ ID NO:69 (partielle KLH1 Domäne b'),  
SEQ ID NO:70 (KLH1 Domäne e'),  
SEQ ID NO:71 (KLH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:72 (KLH1 Domäne g),  
SEQ ID NO:73 (KLH1 Domäne h),  
SEQ ID NO:74 (KLH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:75 (KLH2 Domäne c'),  
SEQ ID NO:76 (KLH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:77 (KLH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:78 (KLH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:79 (KLH2 Domäne g')

oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist.

Hämocyanin-Polypeptide, deren Sequenz über einen Teilbereich von mindestens 90 Aminosäuren mindestens 60% oder 70%, vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% oder 95% Homologie zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NO:25 bis 48 und SEQ ID NO:63 bis 79 aufweist, werden von der Erfindung ebenfalls umfaßt.

In diesem Zusammenhang bezieht sich der Ausdruck "mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% Homologie" auf Übereinstimmung auf der Ebene der Aminosäuresequenz, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck „Homologie“ bezeichnet hier den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehrerer Polypeptid-Molekülen, der durch die

Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird, wobei unter Übereinstimmung sowohl identische Übereinstimmung als auch konservativer Aminosäure-Austausch zu verstehen ist. Der Prozentsatz der „Homologie“ ergibt sich aus dem Prozentsatz übereinstimmender Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Der Begriff "konservativer Aminosäure-Austausch" bezieht sich auf einen Austausch eines Aminosäurerestes durch einen anderen Aminosäurerest, wobei der Austausch nicht zu einer Änderung der Polarität oder Ladung führt. Ein Beispiel für einen konservativen Aminosäure-Austausch ist der Austausch eines unpolaren Aminosäurerestes durch einen anderen unpolaren Aminosäurerest.

Die Homologie miteinander verwandter Polypeptid-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. *et al.*, J. Molec Biol 215:403/410 (1990)). Das BLAST X Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. 215:403/410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Homologie verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)
Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 von Henikoff und Henikoff, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 89:10915-10919 (1992)

Lücken-Wert (Gap Penalty):	12
Lückenlängen-Wert (Gap Length Penalty):	4
Schwellenwert der Ähnlichkeit:	0

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Homologie-Wert nicht verringern. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100.000 (expected value) zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60 % wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60 % Homologie bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Homologiegrade.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Hämocyanin-Polypeptide, erhältlich durch das rekombinante Herstellungsverfahren oder Modifikationen davon, bereit.

Bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 25 bis 32 umfassen, wobei die Sequenz mit SEQ ID NO:25 durch SEQ ID NO:63 und/oder SEQ ID NO:32 durch SEQ ID NO:64 ersetzt sein kann. Bevorzugt sind ebenfalls Hämocyanin-Polypeptide, die entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 33 bis 39 oder die Sequenzen SEQ ID NO:65, 66, 34-39 umfassen, wobei SEQ ID NO:35 durch SEQ ID NO:67 und/oder SEQ ID NO:36 durch SEQ ID NO:68 ersetzt sein kann. Besonders be-

vorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um Hämocyanin 1 oder 2 aus *Haliotis tuberculata*.

Insbesondere bevorzugt ist Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata*, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Weiterhin ist insbesondere Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* bevorzugt, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Die Hämocyanine sind durch das in den Beispielen beschriebene selektive Dissoziationsverfahren aus Gesamt-Hämocyanin aus *Haliotis tuberculata* erhältlich.

Weiterhin bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 40 bis 43 oder die Sequenzen SEQ ID NO:40 bis 43 und SEQ ID NO:71 bis 73 umfassen, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:40 durch SEQ ID NO:66 und/oder SEQ ID NO:43 durch SEQ ID NO:70 ersetzt sein kann. Bevorzugt sind ebenfalls Hämocyanin-Polypeptide, die entweder jede der Sequenzen SEQ ID NO: 44 bis 48 oder die Sequenzen SEQ ID NO:44 bis 46, 77, 78, 47, 48 umfassen, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:44 durch SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:45 durch SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:46 durch SEQ ID NO:76 und/oder SEQ ID NO:47 durch SEQ ID NO:79 ersetzt sein kann.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um vollständiges Hämocyanin 1 (KLH1) oder 2 (KLH2) aus *Megathura crenulata*.

Weiterhin wird nicht-glykosyliertes und glykosyliertes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch Expression in zur Glykosylierung fähigen bzw. unfähigen Wirtszellen, bereitgestellt. Je nach vorgesehener Verwendung des Hämocyanin-Polypeptids kann das Glykosylierungsmuster von Hefe, insbesondere methylotropher Hefe, von Pflanzenzellen oder von COS- oder HeLa-Zellen bevorzugt sein.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und physiologisch verträgliche Zusatzstoffe, die im Stand der Technik bekannt sind, enthalten. Vorzugsweise werden die pharmazeuti-

schen Zusammensetzungen zur unspezifischen Immunstimulierung in Form einer Genterapie eingesetzt, wobei nach Transformation mit einem geeigneten Vektor Hämocyanin-Polypeptide exprimiert werden und zur Antigenisierung des Gewebes dienen.

Insbesondere sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das mit einer Antigen-kodierenden DNA-Sequenz verbunden ist, zur spezifischen Immunisierung gegen dieses Antigen vor. Die Immunisierung beruht hierbei, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, auf der unspezifischen Stimulierung des Immunsystems durch Hämocyanin-Polypeptid-Epitope und die weitergehende spezifische Immunisierung durch Erkennung von Antigen-Epitopen durch das Immunsystem.

Eine solche Immunisierung ist besonders wertvoll im Hinblick auf Pathogen-Antigene, ganz besonders aber im Hinblick auf Tumorantigene. Die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen ergibt sich auch aus der Kreuzreaktivität der gebildeten Hämocyaninspezifischen Antikörper mit Kohlenhydratresten, die auf der Oberfläche von Tumoren auftreten, wie z.B. dem Thomsen-Friedenreich-Antigen, das bei der Mehrzahl von humanen Tumoren wie Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinom auftritt.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen zum Behandeln von parasitären Erkrankungen wie Schistosomiasis und für die Kokain-Mißbrauchsvorsorge eingesetzt werden.

Als weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt, die ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid in Verbindung mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Zusatzmitteln enthalten. Wie oben bereits erwähnt, kann ein solches Hämocyanin-Polypeptid aus einer vollständigen Hämocyanin-Untereinheit, aus einer oder mehreren Domänen sowie aus einem oder mehreren Fragmenten solcher Domänen bestehen, vorausgesetzt, daß diese Fragmente noch die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung

zung eignet sich durch die entweder unspezifische Immunstimulation, die allein auf das Hämocyanin zurückzuführen ist, oder durch die spezifische Immunreaktion auf mit dem Hämocyanin assoziierte Antigene z.B. als Antiparasitenmittel, Antivirumittel oder Antitumormittel. So kann sie z.B. zum Behandeln von Schistosomiasis, Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinomen eingesetzt werden, eignet sich jedoch auch zum Behandeln von Bluthochdruck. Die Behandlung von Bluthochdruck wird erreicht, indem eine Immunisierung mit Hilfe von erfindungsgemäßen Hämocyanin- $\beta$ -adrenergen-Rezeptorpeptid-Konstrukten und/oder Fusionsproteinen durchgeführt wird.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen als Impfstoffe verwendet. Sie können somit einen wertvollen Beitrag zur Prophylaxe von durch bekannte Pathogene verursachte Erkrankungen leisten. Dies gilt insbesondere für pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen ein Hämocyanin-Polypeptid an ein Virus, Virusbestandteil, abgetötete Bakterien, Bakterienbestandteile, insbesondere Oberflächenproteine aus Virus- oder Bakterienhüllen, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle, z.B. Kohlenhydrate, Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet.

Zur Applikation sowohl der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als auch der Hämocyanin-Polypeptide eignen sich insbesondere Liposomen. Dementsprechend umfaßt die vorliegende Erfindung Liposomen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Konstrukt oder ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid umfassen.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren zum Herstellen von Liposomen, die für pharmazeutische Zwecke verwendbar sind, bekannt. Die Selektivität der die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Hämocyanin-Polypeptide enthaltenden Liposomen kann durch den zusätzlichen Einbau von Zellerkennungsmolekülen in die Liposomen erhöht werden, die selektiv an Zielzellen binden. Hierzu eignen sich insbesondere

Rezeptorliganden, die an Rezeptoren der Zielzellen binden, oder, besonders im Fall von Tumoren, Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der jeweils anvisierten Zielzellen gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptide sind außerdem als Trägermolekül für Arzneistoffe, wie z. B. Cytostatika, vorgesehen. Die Vergrößerung des Molekulargewichtes verlängert die physiologische Halbwertszeit der Arzneistoffe erheblich, da der Verlust durch Ultrafiltration in der Niere deutlich verringert ist.

Die Zubereitung der Impfstoffe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren; in einigen Ausführungsformen ist die zusätzliche Verwendung von Adjuvantien wie z. B. Freundsches Adjuvant oder Polysacchariden vorgesehen.

Die Erfindung stellt ferner Antikörper bereit, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptid reagieren und erhältlich sind durch Immunisieren eines Versuchstieres mit einem Hämocyanin-Polypeptid. Polyklonale Antikörper können durch Immunisieren beispielsweise von Kaninchen und anschließendem Gewinnen von Antisera erhalten werden. Monoklonale Antikörper können gemäß Standardverfahren durch Immunisieren von z.B. Mäusen, Gewinnen und Immortalisieren der Milzzellen und Klonieren der Hybridome, die für Hämocyanin spezifische Antikörper produzieren, erhalten werden.

Weiterhin wird ein Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle bereitgestellt, das die Schritte umfaßt:

- a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder den erfindungsgemäßen Antikörper und
- b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

Vorzugsweise ist der nachzuweisende Tumor ein Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom.

Es ist beabsichtigt, mit den nachfolgenden Figuren und Beispielen die Erfindung zu erläutern, diese jedoch in keiner Weise einzuschränken. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die ebenfalls umfaßt sind.

Fig. 1 zeigt die Charakterisierung und Aufreinigung von *Haliotis tuberculata* Hämocyanin (HtH):

- (a) Elektronenmikroskopie von negativ gefärbtem Gesamt-HtH, das durch Ultrazentrifugation von Zell-freier Hämolymphe aufgereinigt wurde;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von HtH1 im Vergleich zu KLH (MW 370 kDa);
- (c) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5 % Polyacrylamid) der HtH-Untereinheiten-Präparation, wobei die Anode am unteren Rand liegt;
- (d) Gekreuzte Immunelektrophorese der beiden HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-HtH-Antikörpern aus Kaninchen;
- (e) Elektronenmikroskopie der verbleibenden HtH1-Didekamere (weiße Pfeile) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 (schwarze Pfeile);
- (f) Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie (Biogel A15m) in Gegenwart von Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol-Lösung (pH 5,9) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 in seine Untereinheit und nachfolgender Anreicherung von HtH1 durch Ultrazentrifugation;
- (g) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (6,5 % Polyacrylamid) von durch Gelchromatographie aufgereinigten HtH1- und HtH2-Untereinheiten im Vergleich zum Ausgangsmaterial;
- (h,i) Gekreuzte Immunelektrophorese von chromatographisch aufgereinigten HtH-Untereinheiten; und
- (j,m) Gekreuzte Immunelektrophorese der aufgereinigten HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-KLH-Antikörpern aus Kaninchen, die für KLH1 bzw. KLH2 spezifisch sind.



Fig. 2 zeigt die Untersuchung der Untereinheiten-Organisation von HtH1, wobei für die Immunelektrophorese anti-HtH1-Antikörper aus Kaninchen verwendet wurden und die Anode sich auf der linken Seite befand:

- (a) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe von Elastase;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von Elastase-gespaltener HtH1-Untereinheit;
- (c,d,g-j,l,n,p) Gekreuzte Immunelektrophorese der Elastase-Spaltprodukte der HtH1-untereinheit;
- (e) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe von V8 Protease;
- (f) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von V8 Protease-gespaltener HtH1-Untereinheit und
- (k,m,o) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe der drei angegebenen Proteasen.

Fig. 3 zeigt die Auftrennung von proteolytischen Spaltprodukten der Untereinheit HtH1 mit Hilfe von HPLC.

Fig. 4 zeigt die cDNA-Sequenz von HtH1 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 5 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von HtH1.

Fig. 6 zeigt die cDNA-Sequenz von HtH2 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 7 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von HtH2.

Fig. 8 zeigt die cDNA-Sequenz von KLH1 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 9 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von KLH1.

Fig. 10 zeigt die cDNA-Sequenz von KLH2 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 11 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von KLH2.

## BEISPIELE

### Material und Methoden

#### 1. Gewinnen der Hämolymphe und Isolieren von Hämocyanin

Individuen des europäischen Seeohrs *Haliotis tuberculata* aus dem Bereich der französischen Atlantikküste wurden von S.M.E.L (Blainville sur Mer, Frankreich) und der Firma Biosyn (Fellbach, Deutschland) bereitgestellt. Die Tiere wurden in einem 300 l Seewasser-Aquarium bei 17 ° C gehalten und mit Braunalgen gefüttert. Zur Entnahme der Hämolymphe wurden die Seeohren in einem verschlossenen Plastiksack auf Eis gestellt. Nach einer Stunde waren große Volumina an Hämolymphe durch ihre Haut sezerniert worden. Es stellte sich heraus, daß das durch dieses Verfahren erhaltene Hämocyanin identisch ist mit dem Hämocyanin, das durch Einschneiden einer Mulde in den Fuß heruntergekühlter Meeresschnecken unter Verwendung einer Skalpellklinge gesammelt werden konnte. Die Blutzellen wurden von der Hämolymphe durch Zentrifugation bei 800 g über 30 min bei 4 ° C abgetrennt. Das gesamte Hämocyanin wurde sofort danach durch präparative Ultrazentrifugation bei 30000 g über 4 Stunden bei 4 ° C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das blaue Hämocyanin-Pellet wurde über Nacht in "Stabilisierungs-Puffer" (0,05 M Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 M NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,4) suspendiert und bei 4 ° C gelagert.

Intaktes HtH1 wurde unter Verwendung des von Harris et al., 1995, supra, beschriebenen Verfahrens aus dem gesamten HtH durch selektive Dissoziation von HtH2 in Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol (1%/0,2%)-Lösung, pH 5,9 und nachfolgender Ultrazentrifugation erhalten. Das entstandene, teilweise aufgereinigte HtH1-Pellet wurde aufgelöst und durch Gelfiltration auf einer Biogel A15m-Vorrichtung zur Homogenität aufgereinigt. Der letzte Schritt ergab geringe Mengen von aufgereinigtem HtH2. Natives HtH1 und HtH2 wurde durch Dialyse gegen "Dissoziationspuffer" (0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6) bei 4 ° C über Nacht quantitativ in die Untereinheiten dissoziiert; die Gegenwart von

EDTA war nicht erforderlich. 1 mM PMSF wurde bei jeder Stufe der Aufreinigung hinzugefügt, um die Proteolyse zu hemmen.

## 2. Elektronenmikroskopie

Konventionelles "negative staining" wurde mit dem Einzel-Tropfen-Verfahren (Harris und Horne in Harris, J.R. (Herausgeber) Electron microscopy in biology, (1991), IRL Press Oxford, S. 203-228) durchgeführt. Kohlenstoffträger-Filme wurde anfänglich über 20 Sekunden glühentladen, um sie hydrophil und für das Protein adsorptiv zu machen. Man läßt die Proteinproben an den Kohlenstofffilmen über 60 Sekunden adsorbieren. Sodann werden die Puffersalze durch sequentielles Waschen mit vier aufeinanderfolgenden 20 µl Wassertropfen entfernt. Die Gitter werden schließlich mit einem 20 µl Tropfen 5 % wäßrigen Ammoniummolybdat, enthaltend 1 % Trehalose (pH 7,0) negativ gefärbt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wird ein Zeiss EM 900 Transmissionselektronenmikroskop verwendet.

## 3. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immunelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde gemäß des Verfahrens von Laemmli (Nature 227 (1970), 670-685) durchgeführt. Zur nativen PAGE wurde ein alkalisches System gemäß Markl et al. (1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 mit einem 0,33 M Tris/Borat, pH 9,6 als Gelpuffer und 0,065 M Tris/Borat, pH 9,6 als Elektrodenpuffer verwendet. Gekreuzte und "crossed-line" Immunelektrophorese (IE) wurden gemäß Weeke (Scand. J. Immunol. 2 (1973), Suppl. 1, 47-56) bzw. Kroll (Scand. J. Immunol. 2, Suppl. 1 (1973), 79-81) durchgeführt. Kaninchenantikörper wurden von Charles River Deutschland (Kisslegg, Deutschland) gegen dissoziiertes Gesamt-HtH und aufgereinigtes HtH1 erzeugt. Das Immunisierungsverfahren wurde durchgeführt gemäß Markl und Winter (J. Comp. Physiol. 159B (1989), 139-151).

## 4. Limitierte Proteolyse und Isolierung der Fragmente

Die limitierte Proteolyse wurde bei 37 ° C in 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 durch Hinzufügen eines der nachstehenden Enzyme (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), die in 0,1 M

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0 gelöst waren, durchgeführt: *Staphylococcus aureus* V8-Protease Typ XVII (8400), Papain Typ II aus Papaya-Milch (P-3125), Rinder-Pankreas-Elastase Typ IV (E-0258), Chymotrypsin und Trypsin. Die Hämocyanin-Konzentration lag zwischen 1 und 10 mg/ml. Die Endkonzentration des Enzyms betrug 2 % (Gewicht/Gewicht). Die Proteolyse wurde nach 5 Stunden durch Einfrieren auf  $-20^\circ\text{C}$  beendet. Das HPLC-Verfahren wurde auf einer Vorrichtung von Applied Biosystems (BAI, Bensheim, Deutschland) durchgeführt, die mit einem Modell-1000S-Dioden-Array-Detektor ausgestattet war. Die proteolytischen Fragmente wurden auf kleine Mono-Q-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen (Pharmacia, Freiburg, Deutschland), die mit 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert worden war und mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (0,0 M - 0,5 M CaCl) im gleichen Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert wurden. Alternativ wurden die proteolytischen Fragmente durch Ausschneiden der Banden aus nativen PAGE-Gelen (Markl et al., 1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 isoliert, nachdem sie zuvor mit dem Roti-White-System (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemäß Fernandez-Patron et al. (1995) Anal. Biochem. 224, 203-211 invers-gefärbt worden waren. Zur nachfolgenden Spaltung mit einem zweiten Enzym wurden die isolierten Fragmente zuerst Übernacht gegen 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 dialysiert, um NaCl zu entfernen.

### 5. Aminosäuresequenzanalyse

Die durch das HPLC-Verfahren erhaltenen Proteine wurden in SDS-enthaltendem Probenpuffer denaturiert und durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970, supra; 7,5 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Um die Blockierung des  $\text{NH}_2$ -Terminus zu verhindern wurde 0,6 % (Gewicht/Gewicht) Thioglykolsäure zum Kathodenpuffer (Walsh et al., Biochemistry 27 (1988), 6867-6876) hinzugefügt. Die Proteinbanden wurden durch Elektro-Transfer auf ProBlot-Membranen (Applied Biosystems, Deutschland) in einer vertikalen Blotting-Kammer übertragen (25 mM Borat-Puffer, pH 8,8, enthaltend 2 mM EDTA; 10 min/100 mA, 15 min/200 mA, 12 h/300 mA). Der Nachweis der einzelnen Polypeptide auf den Membranen wurde mit der Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Die interessierenden Polypeptid-Banden wurden ausgeschnitten und in einer 477A-Protein-Sequenzier-Vorrichtung von Applied Biosystems sequenziert. Die Mengen der auf die Sequenzier-Vorrichtung aufgetragenen Polypeptide lag im unteren pmol-Bereich.

## 6. cDNA-Klonierung und Sequenzanalyse

Eine Lambda-cDNA-Expressionsbibliothek wurde aus Poly(A<sup>+</sup>)-RNA aus *Haliotis* Mantelgewebe unter Verwendung des Vektors Lambda ZAP Express<sup>®</sup> gemäß den Herstelleranweisungen (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Klone wurden unter Verwendung von HtH-spezifischen Kaninchenantikörpern isoliert. Die Nukleotidsequenzierung wurde auf beiden Strängen unter Verwendung des Taq Dye deoxy Terminator<sup>®</sup>-Systems durchgeführt. Die Anordnung der Sequenzen wurde mit der Software CLUSTAL W (1.7)<sup>®</sup> und TREEVIEW<sup>®</sup> (Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22 (1994), 4673-4680) durchgeführt.

### Beispiel 1:

#### **Isolierung von HtH und Auftrennung zweier unterschiedlicher Typen (HtH1 und HtH2)**

Die Hämolymphe wurde aus adulten Seeohren gewonnen. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation entfernt und das Hämocyanin wurde sodann durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Das blaue Hämocyanin-Pellet wurde in "Stabilisierungspuffer" (pH 7,4) wieder aufgelöst und in der Elektronenmikroskopie untersucht (Figur 1a). Es bestand hauptsächlich aus typischen Di-Dekameren, begleitet von einem kleinen Anteil an Dekameren und Tridekameren. Die Denaturierung in 2 % SDS in Gegenwart reduzierender Substanzen und anschließender SDS-PAGE-Trennung ergab eine einzige Bande, die dem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 370 kDa entsprach, welches nur geringfügig unterhalb des scheinbaren Untereinheiten-Gewichts von KLH (Figur 1b) liegt. Die vollständige Dissoziation der Oligomere wie der Di-Dekamere in die nativen Polypeptide (Untereinheiten) wurde erreicht durch Übernacht-Dialyse von HtH gegen "Dissoziationspuffer" (pH 9,6). Natives PAGE-Verfahren, das auf diese Proben angewendet wurde, ergab eine Haupt- und eine Neben-Komponente (Figur 1c). Die gekreuzte Immunelektrophorese (gekreuzte IE) unter Verwendung von gegen aufgereinigtes Gesamt-HtH-erzeugten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern zeigte zwei Komponenten, die immunologisch unterschiedlich sind, jedoch die klassische Reaktion einer teilweise immunologischen Identität aufweisen (Figur 1d). Ihre präparative Isolierung (Fi-

gur 1e-i) zeigte, daß sie die Untereinheiten von zwei unterschiedlichen HtH-Typen darstellen, bezeichnet als HtH1 und HtH2, und die Muster der nativen PAGE- und gekreuzten IE-Verfahren konnten jeder einzelnen zugeordnet werden (Figur 1c, d).

Die Auftrennung von HtH1 und HtH2 wurde gemäß des Verfahrens zur selektiven Dissoziation gemäß Harris et al., 1995, supra, durchgeführt. In Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol war HtH1 im Oligomeren-Zustand (Di-Dekamere) vollständig stabil, wohingegen HtH2 vollständig in die Untereinheiten dissoziierte (Figur 1e). Dies ermöglichte die quantitative Sedimentation von HtH1 in der Ultrazentrifuge, wohin gegen der größte Teil des HtH2 im Überstand verblieb. Aus dem wieder aufgelösten Pellet wurden große Mengen an HtH1 durch Gelfiltrationschromatographie zur Homogenität aufgereinigt, welche auch geringe Mengen an reinem HtH2 ergab (Figur 1f). Die Fraktionen wurden durch native PAGE (Figur 1g) und gekreuzte IE (Figur 1h, i) untersucht. Das Verfahren der selektiven Dissoziation von HtH2 entfernte sämtliche Tri-Dekamere aus den Proben, welches nahelegt, daß die letzteren aus HtH2, jedoch nicht aus HtH1 aufgebaut sind (Figur 1e). Das selektive Dissoziationsverhalten von HtH2 und auch die Fähigkeit, Aggregate zu bilden, die größer als *in vivo* -Di-Dekamere sind, entspricht den Eigenschaften von KLH2. Umgekehrt ähnelt die Stabilität von HtH1 unter diesen Bedingungen und seine Unfähigkeit, sich zu größeren Aggregaten als Di-Dekameren zu assemblieren, dem Verhalten von KLH1. Diese Verwandtschaft wird weiter belegt durch die Reaktion von Anti-KLH1 bzw. Anti-KLH2 Antikörpern gegen die beiden HtH-Typen (Figur 1j-m).

### **Beispiel 2:**

#### **Analyse der Organisation der HtH1-Untereinheit**

Die acht funktionellen Einheiten (FU's, häufig als "funktionelle Domänen" bezeichnet), die eine Mollusken-Hämocyanin-Untereinheit bilden, unterscheiden sich in der Primärstruktur und weisen keine immunologische Kreuz-Reaktivität auf, wie sich aus gekreuzter IE ergibt. Im Fall der aufgereinigten HtH1 Untereinheit (Figur 1g, h) wurden geringe Konzentrationen fünf unterschiedlicher Proteasen (Elastase, V8-Protease, Papain, Trypsin und Chymotrypsin) verwendet, welche die Peptid-Bindungen zwischen benachbarten FU's von KLH1 und KLH2 gespalten hatten (Gebauer et al., 1994, supra, Söhnngen et al., 1997, supra). Die Spaltprodukte wurden durch gekreuzte IE und SDS-PAGE

(Fig. 2) untersucht. Elastase-Behandlung erzeugt acht einzelne FU's, abgeleitet aus der Anzahl an unterschiedlichen Immunpräzipitations-Gipfeln in der gekreuzten IE (Fig. 2a) und mit dem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 50 kDa des Hauptteils der Spaltprodukte in SDS-PAGE (Fig. 2b). Ein weiterer Präzipitationsgipfel wurde als FU-Dimer erkannt, welches durch unvollständige Spaltung des Segments ab (Fig. 2a) entstand. Durch HPLC-Verfahren mit einer Mono-Q-Säule (Fig. 3a) wurden zwei der Elastase-Spaltprodukte in einer ausreichenden Reinheit erhalten, um durch "crossed-line-IE" ihre klare Zuordnung zu zwei der acht Präzipitationsgipfel (Fig. 2c,d) zu ermöglichen. Die anderen vier Proteasen wiesen unterschiedliche Spaltmuster auf, die aus Gemischen einzelner FU's und größerer Fragmente, enthaltend zwei, drei oder mehrere FU's bestanden (z.B. Fig. 2 e,f). Viele von ihnen waren durch das HPLC-Verfahren in ausreichender Menge angereichert (Fig. 3b-e), um ihre Identifikation in ihren entsprechenden SDS-PAGE- und gekreuzten IE-Mustern zu ermöglichen. Eine Anzahl dieser Komponenten wurde N-terminal durch Blot-Transfer von SDS-Gelen auf ProBlot®-Membrane (Tabelle I) sequenziert. Die Resultate wurden mit N-terminalen Sequenzen verglichen, die aus dem scheinbar orthologen Protein in *Megathura crenulata*, KLH1 (Tabelle I), erhalten worden waren, von dem die vollständige FU-Anordnung verfügbar ist (Söhngen et al., 1997, supra; vgl. Fig. 5b). Das Ergebnis des gesamten Ansatzes führte zur Bestimmung der vollständigen FU-Anordnung innerhalb der HtH1-Untereinheit (Fig. 2a).

Insbesondere ergab die Spaltung der HtH1-Untereinheit (1-abcdefgh) mit V8-Protease vier Präzipitationsgipfel in der gekreuzten IE (Fig. 2e). Das SDS-PAGE-Verfahren zeigte fünf unterschiedliche Fragmente (Fig. 2f): 220 kDa (5 FU's), 185 kDa (4 FU's), 100 kDa (2 FU's), 55 kDa (1 FU) und 46 kDa (1 FU). Das 100 kDa-Fragment wurde durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3b) isoliert und durch N-terminale Sequenzierung als 1-ab identifiziert, da die Sequenz identisch zu derjenigen der intakten Untereinheit war (Tabelle I). In dem "crossed-line" IE-Verfahren verschmolz 1-ab mit drei Präzipitationsgipfeln des Elastase-Spaltmusters. Aufgrund der Auswertung ergab sich, daß sie die Fragmente 1-ab, 1-a bzw. 1-b darstellen (Fig. 2g). Jedoch verblieb es unklar, welcher Gipfel 1-a und welcher 1-b darstellt. In einem zweiten Schritt wurde das HPLC-aufgereinigte 1-ab durch Elastase in seine Komponenten-FU's gespalten, aus denen eine durch das native PAGE-Gel-Streifenverfahren eluiert werden konnte und dem Elastase-Muster durch das "crossed-line" IE-Verfahren (Fig. 2h) zugeordnet und N-terminal sequenziert wurde.

Diese Komponente wies die gleiche N-terminale Sequenz wie die gesamte Untereinheit auf und war deshalb identisch zu 1-a. Somit ist die zweite FU des 100 kDa-Fragments 1-b (Fig. 2a; Tabelle I). Ebenso wurden HPLC-aufgereinigtes 1-c und 1-h erhalten (Fig. 3b), durch N-terminale-Sequenzähnlichkeiten zu den entsprechenden FU's in KLH1 (Tabelle I) identifiziert und durch das "crossed-line" IE-Verfahren ihren entsprechenden Präzipitationsgipfeln in dem Elastase-Muster zugeordnet (Fig. 2i,j). Weiterhin wurden 1-a, 1-b, 1-c und 1-h identifiziert (Fig. 2a). Unter Verwendung von Papain zur Untereinheiten-Spaltung wurden fünf unterschiedliche Gipfel in dem gekreuzten IE-Verfahren (Fig. k) erhalten. Aus einer solchen Probe wurde ein 100 kDa-Fragment (2 FU's) durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3c) aufgereinigt, welches gemäß des "crossed-line" IE-Verfahrens das bereits identifizierte FU 1-h und eine der vier noch nicht identifizierten FU's enthielt und deshalb 1-gh darstellen muß (Figs. 2k, 3c). Tatsächlich wies dieses Fragment eine N-terminale Sequenz auf, die Ähnlichkeiten zu KLH1-g (Tabelle I) zeigte. Zur weiteren Bestätigung wurde das HPLC-aufgereinigte Fragment 1-gh mit Elastase in seine Bestandteil-FU's gespalten, aus denen 1-g aufgereinigt und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert wurde. Es wurde durch "crossed-line" IE-Verfahren seinem Gipfel in dem Elastase-Spaltmuster zugeordnet (Fig. 2l).

Das 220 kDa-Fragment aus der V8-Protease-Spaltung (Fig. 2e, f) wurde HPLC-aufgereinigt (Fig. 3b) und fusionierte im "crossed-line" IE-Verfahren mit 1-h, 1-g und drei noch nicht identifizierten Gipfeln des Elastase-Spaltmusters. Weiterhin wurde das 185 kDa-Fragment in ausreichender Reinheit erhalten (Fig. 2e, f; 3b), und es wurde gezeigt, daß sie die gleichen Komponenten mit Ausnahme von 1-h enthielten. Dies legte nahe, daß das 22 kDa und das 185 kDa-Fragment 1-defgh bzw. 1-defg sind. Tatsächlich war die N-terminale Sequenz praktisch identisch und zeigte weiterhin Ähnlichkeit zu KLH1-d (Tabelle I). Die Spaltung der HtH1-Untereinheit mit Trypsin ergab eine Vielzahl an Komponenten in dem Molekulargewichtsbereich von ein bzw. zwei FU's (Fig. 2m). Mehrere der Komponenten wurden in HPLC-Fraktionen angereichert (Fig. 3d). Ein 100 kDa-Fragment erwies sich als besonders nützlich, da es die gleiche N-terminale Sequenz wie das Fragment 1-defg aus der V8-Protease-Spaltung aufwies (Tabelle I); deshalb sollte das 100 kDa-Fragment 1-de darstellen. In dem "crossed-lined" IE-Verfahren fusionierte diese Komponente mit zwei der drei noch nicht identifizierten FU-Gipfeln des Elastase-Spaltmusters (Fig. 2n), welches deshalb 1-d und 1-e darstellen sollte, und somit eine



einzigste Möglichkeit für 1-f übrig ließ. Das "crossed-line" IE-Verfahren zeigte auch, daß in der 1-de Fraktion weiterhin FU 1-f vorhanden war (Fig. 2n). Die Identifikation von 1-f bestätigte durch Spaltung der Untereinheit mit Chymotrypsin (Fig. 2o) und nachfolgendem HPLC-Verfahren (Fig. 3e). Diese Spaltung ergab unter anderem ein 95 kDa-Fragment (2 FU's) welches im "crossed-line"-IE-Verfahren mit 1-g und einem zweiten Gipfel (Fig. 2p) fusionierte und deshalb entweder 1-gh (welches ausgeschlossen werden konnte, da 1-h bereits identifiziert war), oder 1-fg (welches sinnvoll erscheint aufgrund des weiteren betreffenden Peaks, der zu dem verbleibenden Kandidaten identisch war) sein könnte. Tatsächlich zeigte dieses Fragment eine neue N-terminale Sequenz, welche in gewisser Weise zu KLH1-f ähnlich ist (Tabelle I). Das letzte Problem bestand nun darin, die zwei verbleibenden FU-Gipfel 1-d bzw. 1-e zuzuordnen. Dies wurde unter Verwendung von HPLC-isolierten FU's aus Proben gelöst, in denen die Untereinheit mit Elastase gespalten worden war. (Fig. 2c, d; 3a). Die saurere Komponente in dem gekreuzten IE-Verfahren war 1-d abgeleitet aus seiner N-terminalen Sequenz, welche identisch ist mit der von 1-defgh (Fig. 2c; Tabelle I), wohingegen die basischere Komponente des 1-d/1-g-Paares eine neue N-terminale Sequenz (Tabelle I) aufwies und deshalb 1-e (Fig. 2a) sein mußte. Somit war die Struktur der funktionellen Einheiten der Untereinheit HtH1 aufgeklärt.

### **Beispiel 3:**

Vergleich der Molekulargewichte und N-terminalen Sequenzen der biochemisch isolierten funktionellen Einheiten (FU's) aus HtH1 und KLH1. Die unterschiedlichen FU's, jede mit einer intakten binukleären Kupfer-Bindungsstelle, wurden durch limitierte Proteolyse als globuläre Segmente aus ihrer größeren Einheit freigesetzt; vgl. Abschnitt "Isolierung und Analyse der Einheiten aus HtH1". Die KLH1-Daten wurden aus Söhngen et al., supra, entnommen. Die Zuordnung als tatsächliche Einheit erfolgte aufgrund des Molekulargewichtes und des immunologischen Verhaltens (vgl. Fig. 2). Das ungewöhnlich niedrige Molekulargewicht von isoliertem HtH1-d könnte bedeuten, daß ein großes Peptid C-terminal abgespalten wurde.

TABELLE I

Funktionelle Einheit	Masse (kDa)	N-terminale Sequenz
HtH1-a	53	DNVVRKDVSHLTDDEVQ
KLH1-a	50	ENLVRKDVERL
HtH1-b	48	?
KLH1-b	45	?
HtH1-c	46	FEDEKHSLRIRKNVDSLTP EENTNERLR

TABELLE I

Funktionelle Einheit	Masse (kDa)	N-terminale Sequenz
KLH1-c	45	KVPRSRLIRKNVDRLTPSE
HtH1-d	40	VEEVTGASHIRKNLNDLNTGEM
KLH1-d	50	EVTSANRIRKNIENLS
HtH1-e	49	ILDHDHEEEILVRKNIIDLSP
KLH1-e	50	?
HtH1-f	50	KLNSRKHTPNRVRHELSSLSSRDIASLKA
KLH1-f	45	HHL SXNKVRHDLSTL
HtH1-g	45	DHQSGSIAGSGVRKDVNTLTKAETDNLRE
KLH1-g	45	SSMAGHFVRKDINTLTP
HtH1-h	55	DEHHDDLADVLIRKEVDFLSLQEANA IKD
KLH1-h	60	HEDHHEDILVRKNIHSL

**Beispiel 4:****Klonierung von Hämocyanin-cDNA**

1. Zur Klonierung der cDNA von Hämocyanin wurde mRNA aus dem Mantelgewebe des jeweiligen Mollusken isoliert. Der erste cDNA-Strang wurde durch reverse Transkription mit Oligo(dT) als Primer erhalten. Der zweite Strang wurde durch konventionelle Synthese mit random Primern erhalten. Die so erhaltene cDNA wurde in einen

Lambda-Expressionsvektor kloniert unter Bildung einer cDNA-Expressionsbibliothek. Unter Verwendung eines anti-Hämocyanin-Antikörpers wurde die Bibliothek unter geeigneten Bedingungen abgesucht, wobei positive Klone erhalten wurden. Diese positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.

2. Aus dem N-terminalen Bereich eines erhaltenen positiven Klons wurde eine cDNA-Sonde hergestellt, mit der die cDNA-Bibliothek abgesucht wurde. Die erhaltenen positiven Klone werden wiederum isoliert, sequenziert und charakterisiert.
3. Um noch weiter 5' gelegene Sequenzen zu erhalten, wurde eine weitere Expressionsbibliothek aus cDNA hergestellt, die mit Hilfe einer Kombination von Hämocyanin-spezifischen und „random“-Primern erhalten wurde. Diese cDNA-Bibliothek wurde mit cDNA-Sonden, die den „N-terminalen“ Bereichen der unter (2.) erhaltenen positiven Klone entsprechen, abgesucht. Die erhaltenen positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.

#### **Beispiel 5:**

##### **Klonierung von Hämocyanin-Genen**

Genomische DNA wurde gemäß Standardverfahren isoliert. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe von Hämocyanin-spezifischen Primern durchgeführt, um die Genabschnitte der interessierenden Hämocyanine zu amplifizieren. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden in einen geeigneten Vektor (beispielsweise pGem T oder pGem T easy (Promega, Mannheim) kloniert, sequenziert und charakterisiert.

#### **Beispiel 6:**

##### **Rekombinante Expression von Hämocyanin**

Mit einem cDNA-Klon, der die kodierende Sequenz für HtH-1d enthält, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, um spezifisch die kodierende Sequenz der Domäne 1d zu amplifizieren. Als Primer wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet.

Primer 1 (stromaufwärts) umfaßt sechs Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1c, eine SacI-Schnittstelle und 12 Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1d.

Primer 2 (stromabwärts) umfaßt sechs Nukleotide des Anfangs der Domäne HtH1-e, eine *Sa*I-Schnittstelle und eine HtH1-d spezifische Sequenz.

PCR-Bedingungen: 2 min 95°C  
30 sec 95°C  
30 sec 55°C  
1 min 72°C  
35 Zyklen  
10 min 72°C

Das Amplifikat wurde in dem pGEM T easy PCR Klonierungsvektor (Promega) in XL-1 Blue (Stratagene) kloniert. Nach Isolation des rekombinanten Plasmids und Restriktion mit *Sac*I und *Sa*I konnte die cDNA der Domäne 1d isoliert werden. Der Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) wurde ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen restringiert.

Anschließend wurde die Ligation zwischen der HtH-1d-cDNA (restringiert mit *Sac*I und *Sa*I) und pQE (restringiert mit *Sac*I und *Sa*I) durchgeführt. Somit ist eine gerichtete Klonierung der cDNA, kodierend für HtH-1d, in einen Expressionsvektor möglich. Die Expression von HtH1-d in pQE in XL-1 Blue erfolgt gemäß Herstelleranleitung. Die Expression weiterer HtH1-, HtH2- oder KLH1- oder KLH2-Domänen kann analog erfolgen.

## Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus:

- (a) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO: 8 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:9 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne d),

SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne e),

SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne f),

SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:15 (HtH2 Domäne h),

SEQ ID NO:16 (partielle KLH1 Domäne b),

SEQ ID NO:17 (KLH1 Domäne c),

SEQ ID NO:18 (KLH1 Domäne d),

SEQ ID NO:19 (partielle KLH1 Domäne e),

SEQ ID NO:20 (KLH2 Domäne b),

SEQ ID NO:21 (KLH2 Domäne c),

SEQ ID NO:22 (partielle KLH2 Domäne d),

SEQ ID NO:23 (KLH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:24 (partielle KLH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:49 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:50 (partielle HtH2 Domäne a),  
SEQ ID NO:51 (HtH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:52 (HtH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:53 (HtH2 Domäne e'),  
SEQ ID NO:54 (KLH1 Domäne e'),  
SEQ ID NO:55 (KLH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:56 (KLH1 Domäne g),  
SEQ ID NO:57 (KLH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:58 (KLH2 Domäne c'),  
SEQ ID NO:59 (KLH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:60 (KLH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:61 (KLH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:62 (KLH2 Domäne g'),  
SEQ ID NO:80 (HtH1 Domäne a'' + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:81 (HtH1 Domäne b'),  
SEQ ID NO:82 (HtH1 Domäne c'),  
SEQ ID NO:83 (HtH1 Domäne d'),  
SEQ ID NO:84 (HtH1 Domäne e'),  
SEQ ID NO:85 (HtH1 Domäne f'),  
SEQ ID NO:86 (HtH1 Domäne g'),  
SEQ ID NO:87 (HtH1 Domäne h'),  
SEQ ID NO:88 (partielle HtH2 Domäne a''),  
SEQ ID NO:89 (HtH2 Domäne b'')  
SEQ ID NO:90 (HtH2 Domäne c'),  
SEQ ID NO:91 (HtH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:92 (HtH2 Domäne e'),  
SEQ ID NO:93 (HtH2 Domäne f'),  
SEQ ID NO:94 (HtH2 Domäne g'),  
SEQ ID NO:95 (HtH2 Domäne h'),  
SEQ ID NO:96 (partielle KLH1 Domäne b''),

SEQ ID NO:97 (KLH1 Domäne c"),  
SEQ ID NO:98 (KLH1 Domäne d"),  
SEQ ID NO:99 (KLH1 Domäne e"),  
SEQ ID NO:100 (KLH1 Domäne f"),  
SEQ ID NO:101 (KLH1 Domäne g"),  
SEQ ID NO:102 (KLH2 Domäne b"),  
SEQ ID NO:103 (KLH2 Domäne c"),  
SEQ ID NO:104 (KLH2 Domäne d"),  
SEQ ID NO:105 (KLH2 Domäne e"),  
SEQ ID NO:106 (KLH2 Domäne f"),  
SEQ ID NO:107 (KLH2 Domäne g"),  
SEQ ID NO:108 (partielle KLH2 Domäne h");

- (b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) Varianten der unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten gegenüber den unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die im-

munologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist;  
und

(g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

4. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

5. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

6. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Desoxyribonukleinsäuremolekül ist.

7. Konstrukt, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

8. Konstrukt gemäß Anspruch 7, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.

9. Konstrukt gemäß Anspruch 7 oder 8, weiterhin umfassend eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-



Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierenden Nukleinsäuresequenz verbunden ist.

10. Konstrukt gemäß Anspruch 9, wobei das Antigen ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene.

11. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei das Konstrukt wenigstens einen Teil eines Vektors enthält, wobei der Vektor ausgewählt ist aus: Bakteriophagen, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Virus und Retroviren.

12. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei das Konstrukt weiterhin eine His-Tag-kodierende Nukleinsäuresequenz umfaßt und die Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag führt.

13. Wirtszelle, enthaltend ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Konstrukts geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.

14. Wirtszelle gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die prokaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus E. coli und Bacillus subtilis.

15. Wirtszelle gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eukaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerkzellen, bevorzugt aus CHO-Zellen, COS-Zellen und HeLa-Zellen.

16. Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptides, wobei das Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder das Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird und das Protein gegebenenfalls isoliert wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hergestellte Hämocyanin-Polypeptid natürlich oder chemisch modifiziert wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Modifikation eine Quervernetzung oder eine kovalente Bindung an ein Antigen ist.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression in einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 durchgeführt wird.

20. Hämocyanin-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die von einem oder mehreren der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.

21. Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 20, umfassend wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz:

SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:27 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:28 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:29 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:30 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:31 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO:32 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:33 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:34 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:35 (HtH2 Domäne d),

SEQ ID NO:36 (HtH2 Domäne e),

SEQ ID NO:37 (HtH2 Domäne f),

SEQ ID NO:38 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:39 (HtH2 Domäne h),

SEQ ID NO:40 (partielle KLH1 Domäne b),

SEQ ID NO:41 (KLH1 Domäne c),

SEQ ID NO:42 (partielle KLH1 Domäne d),

SEQ ID NO:43 (partielle KLH1 Domäne e),

SEQ ID NO:44 (KLH2 Domäne b),

SEQ ID NO:45 (KLH2 Domäne c),  
SEQ ID NO:46 (partielle KLH2 Domäne d),  
SEQ ID NO:47 (KLH2 Domäne g),  
SEQ ID NO:48 (partielle KLH2 Domäne h),  
SEQ ID NO:63 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),  
SEQ ID NO:64 (HtH1 Domäne h'),  
SEQ ID NO:65 (partielle HtH2 Domäne a)  
SEQ ID NO:66 (HtH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:67 (HtH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:68 (HtH2 Domäne e'),  
SEQ ID NO:69 (partielle KLH1 Domäne b'),  
SEQ ID NO:70 (KLH1 Domäne e'),  
SEQ ID NO:71 (KLH1 Domäne f),  
SEQ ID NO:72 (KLH1 Domäne g),  
SEQ ID NO:73 (KLH1 Domäne h),  
SEQ ID NO:74 (KLH2 Domäne b'),  
SEQ ID NO:75 (KLH2 Domäne c'),  
SEQ ID NO:76 (KLH2 Domäne d'),  
SEQ ID NO:77 (KLH2 Domäne e),  
SEQ ID NO:78 (KLH2 Domäne f),  
SEQ ID NO:79 (KLH2 Domäne g')

oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist.

22. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 19 oder Modifikationen davon.

23. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Sequenzen SEQ ID NO: 25 bis 32 umfaßt und Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata* ist, wobei die Sequenz mit SEQ ID NO:25 durch SEQ ID NO:63 und/oder SEQ ID NO:32 durch SEQ ID NO:64 ersetzt sein kann.

24. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß es entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 33 bis 39 oder die Sequenzen SEQ ID NO:65, 66, 34-39 umfaßt und Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* ist, wobei jeweils SEQ ID NO:35 durch SEQ ID NO:67 und/oder SEQ ID NO:36 durch SEQ ID NO:68 ersetzt sein kann.

25. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

26. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

27. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 40 bis 43 oder die Sequenzen SEQ ID NO:40 bis 43 und SEQ ID NO:71 bis 73 umfaßt und KLH1 aus *Megathura crenulata* ist, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:40 durch SEQ ID NO:66 und/oder SEQ ID NO:43 durch SEQ ID NO:70 ersetzt sein kann.

28. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 44 bis 48 oder die Sequenzen SEQ ID NO:44 bis 46, 77, 78, 47, 48 umfaßt und KLH2 aus *Megathura crenulata* ist, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:44 durch SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:45 durch SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:46 durch SEQ ID NO:76 und/oder SEQ ID NO:47 durch SEQ ID NO:79 ersetzt sein kann.

29. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß es kovalent an Viren, Virenbestandteile, Bakterien, Bakterienbestandteile, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle wie z. B. Kohlenhydrate Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

30. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid nicht-glykosyliert ist.

31. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid glykosyliert ist.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.

33. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zur gentherapeutischen Behandlung von Tumoren verwendet wird.

34. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Hämocyanin-Polypeptid nach einem der Ansprüche 20 bis 31 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als Antiparasitenmittel, Antivirusmittel oder als Antitumormittel verwendet wird.

36. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zum Behandeln einer der folgenden Erkrankungen verwendet wird: Schistosomiasis, Bluthochdruck, Oberflächen-Harnblasenkarzinomen, Epithelkarzinomen, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Kolonrektalkarzinom.

37. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als Impfstoff verwendet wird.

38. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet wird.

39. Verwendung von Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31 als Trägerstoff für Arzneimittel.

40. Liposom, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 und/oder ein Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31.

41. Liposom gemäß Anspruch 40, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Liposom weiterhin Zellerkennungsmoleküle umfaßt.

42. Antikörper, erhältlich durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem rekombinanten Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31.

43. Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle umfassend:

a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend die Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder des Antikörpers gemäß Anspruch 42 und

b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

44. Screening-Verfahren gemäß Anspruch 43, **dadurch gekennzeichnet**, daß der nachzuweisende Tumor Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom ist.

1/29

Fig. 1a-f

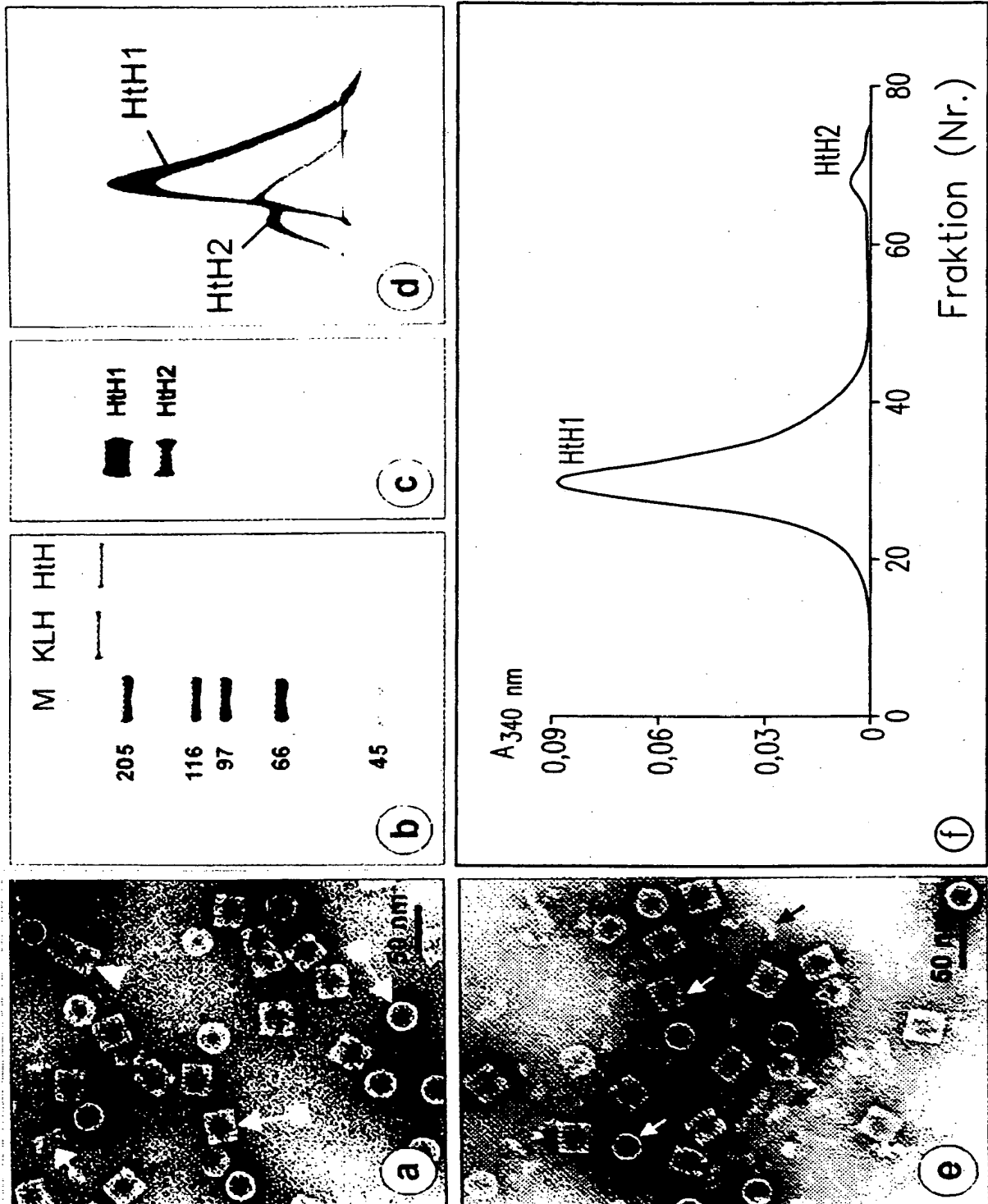






Fig. 1g-m

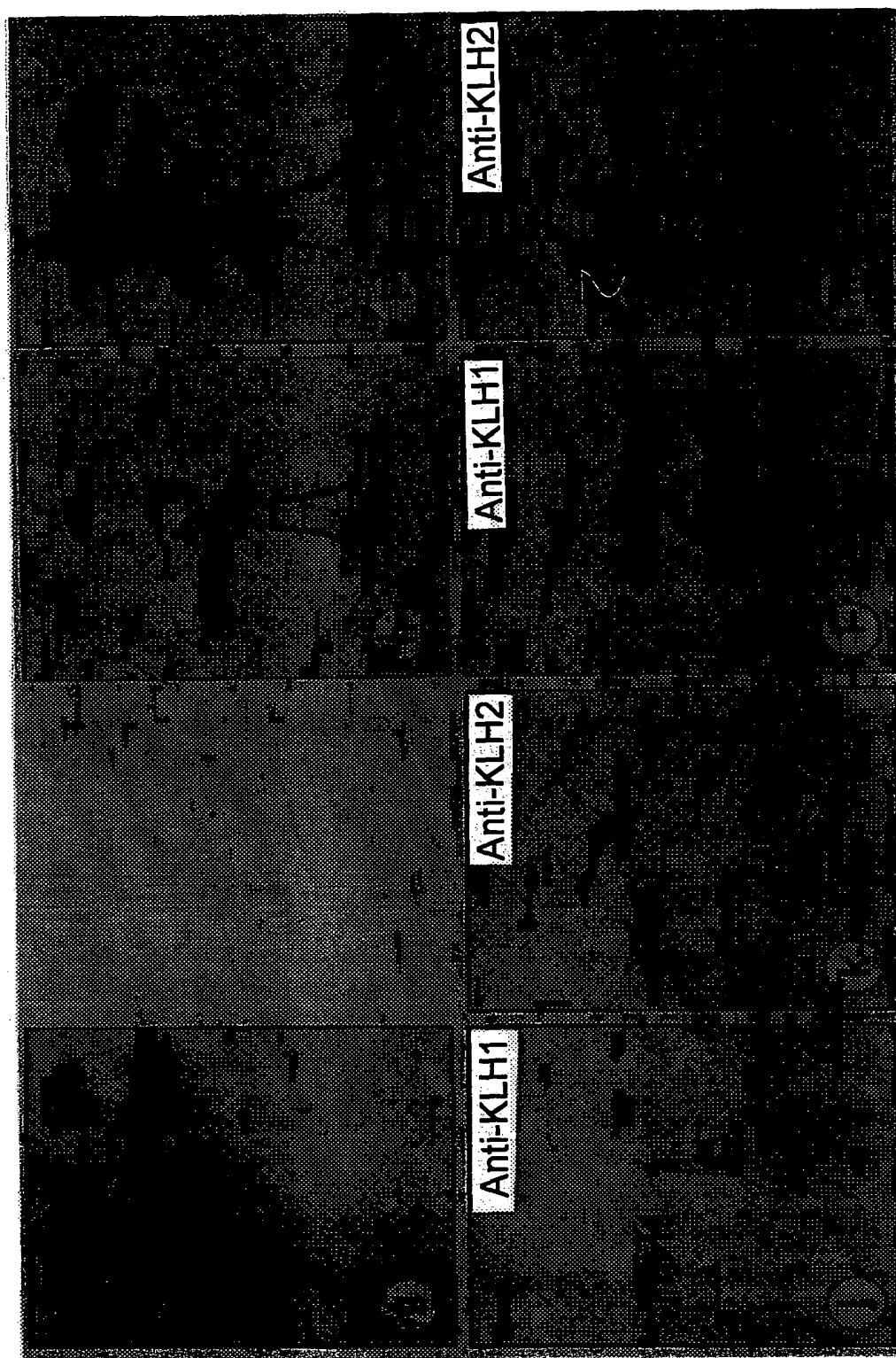




Fig. 2a-h

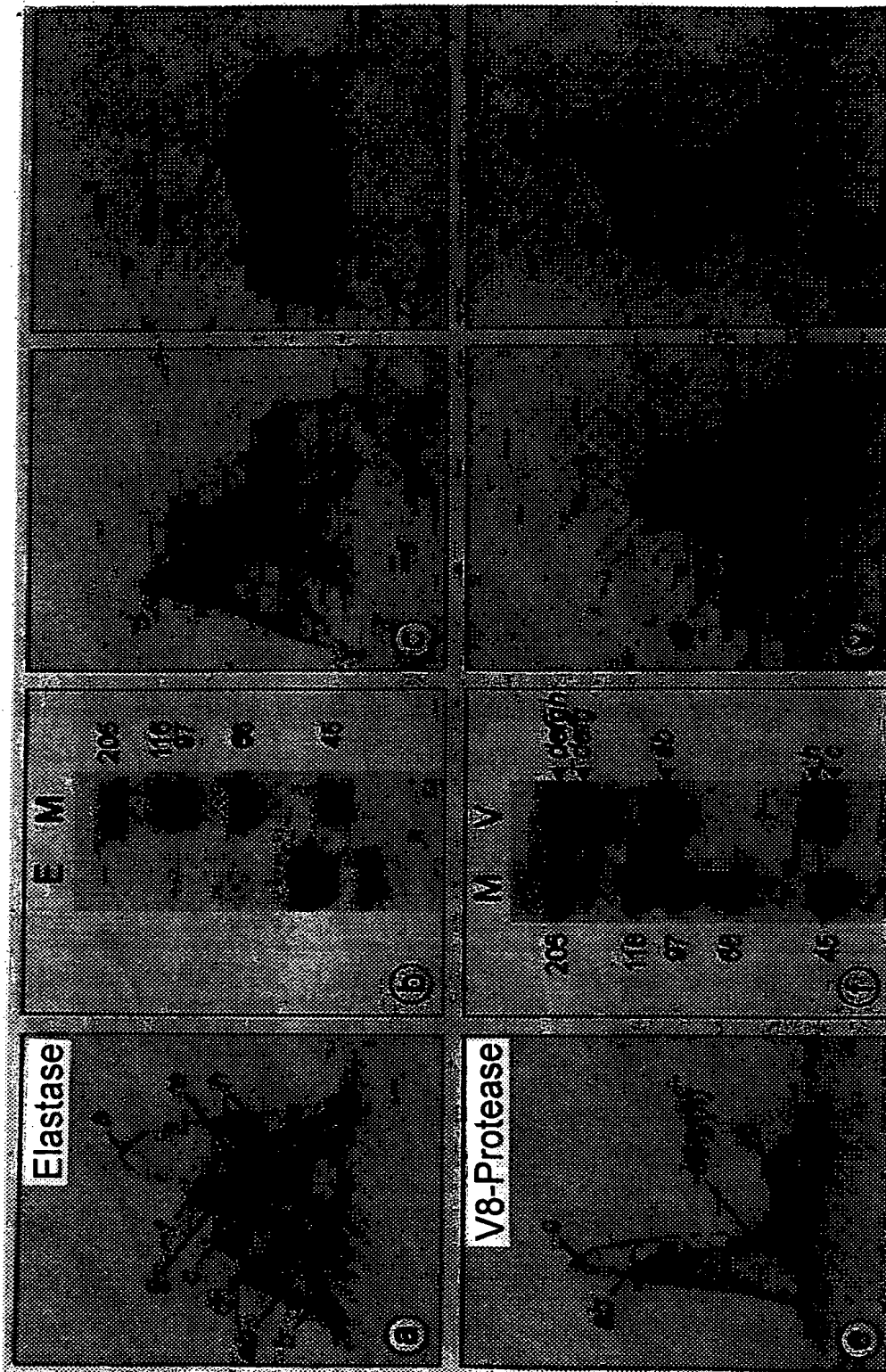
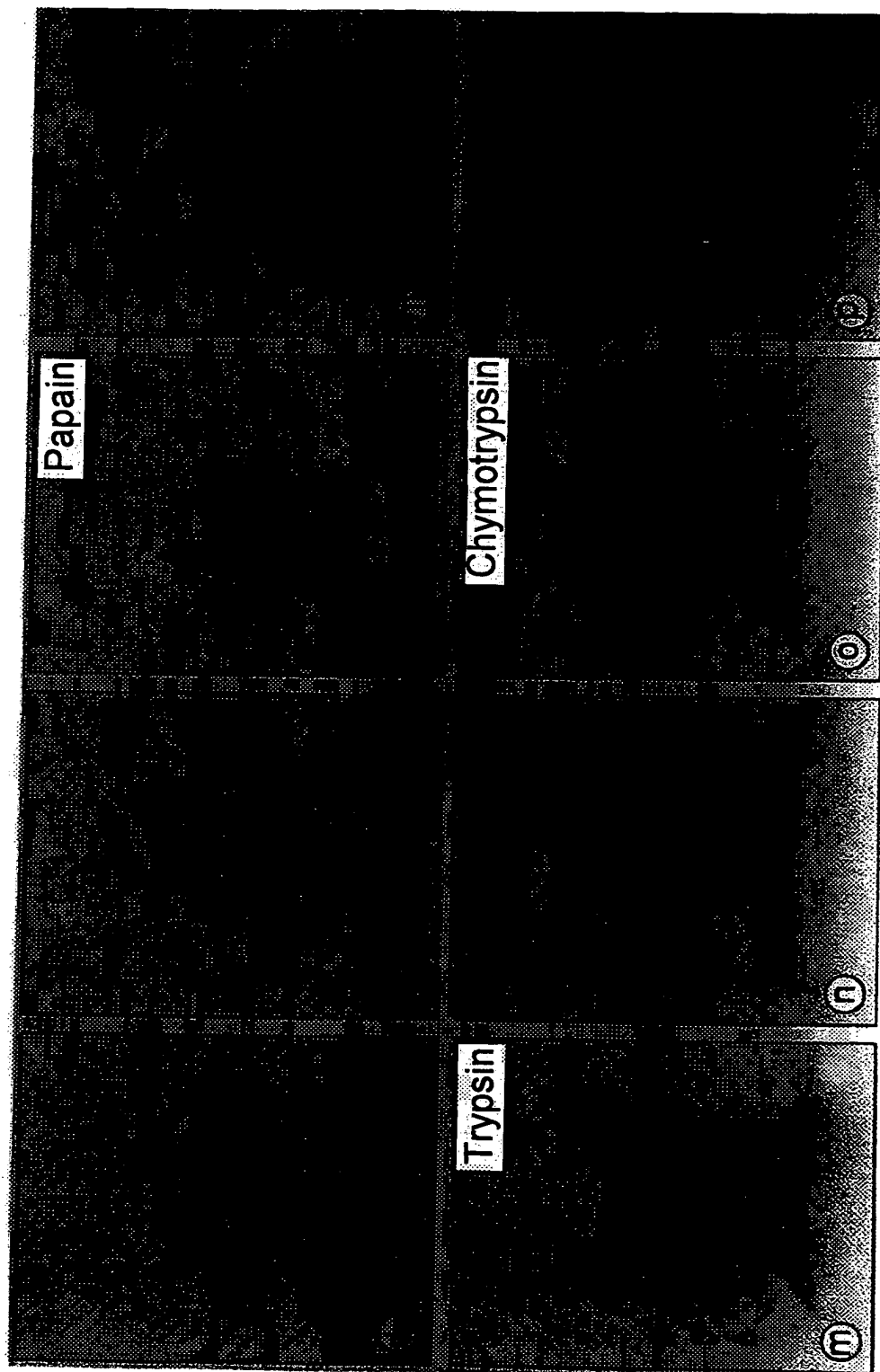




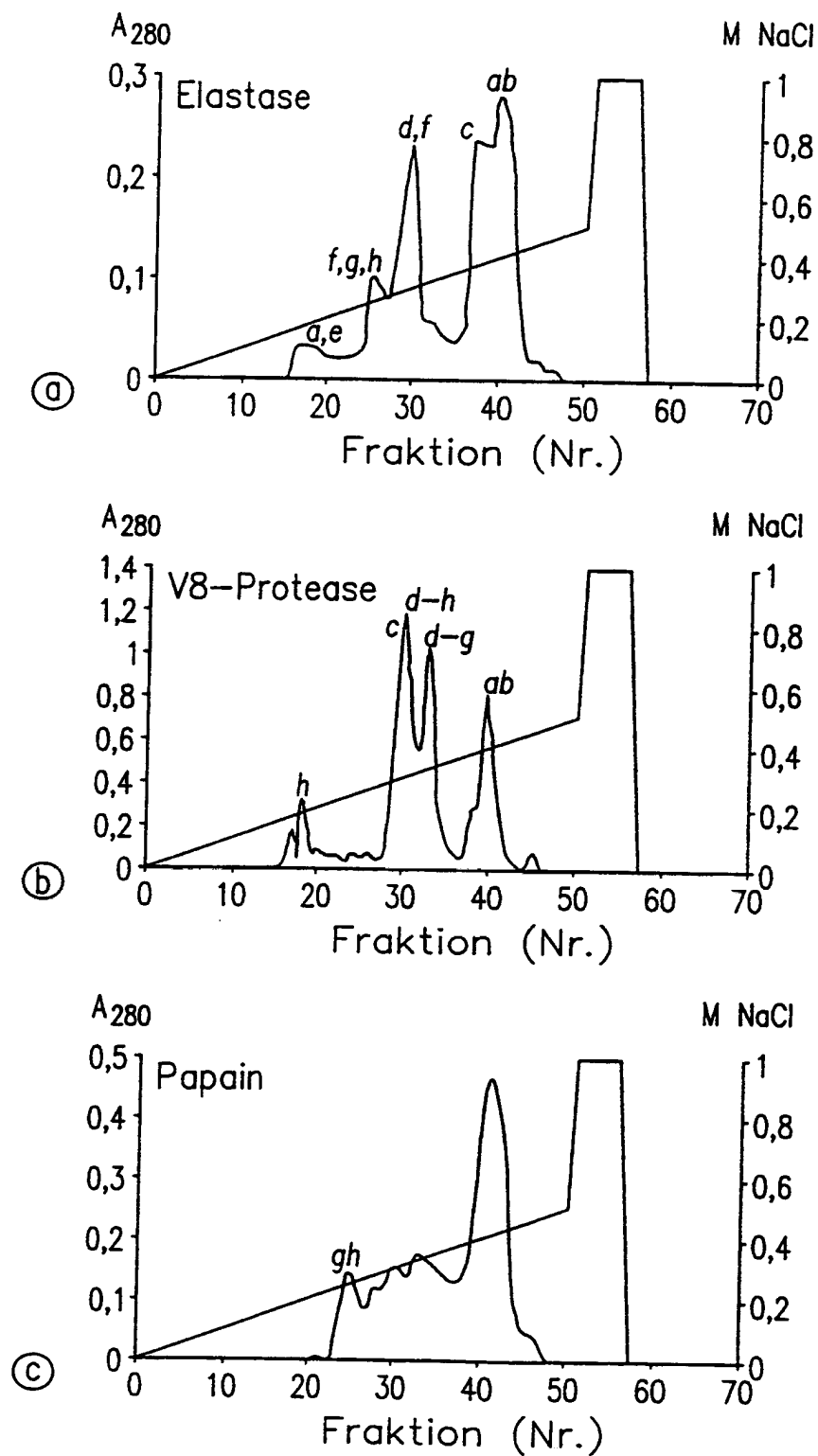
Fig. 2i-p





5/29

Fig. 3a-c

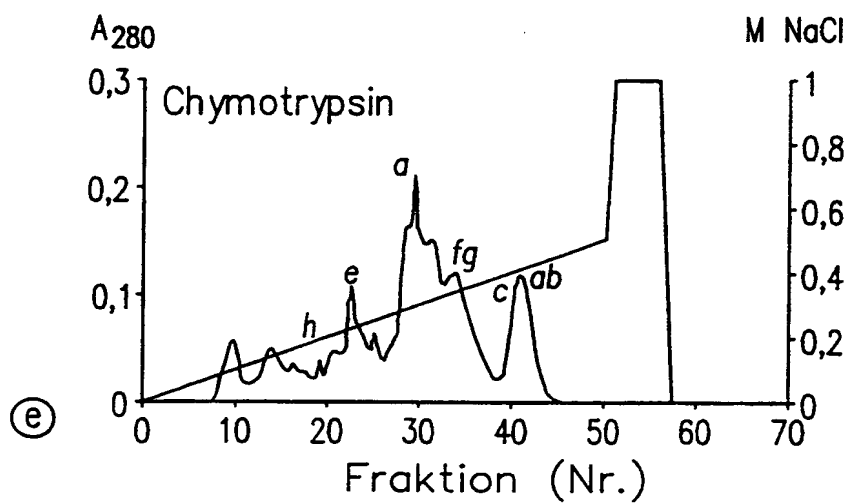
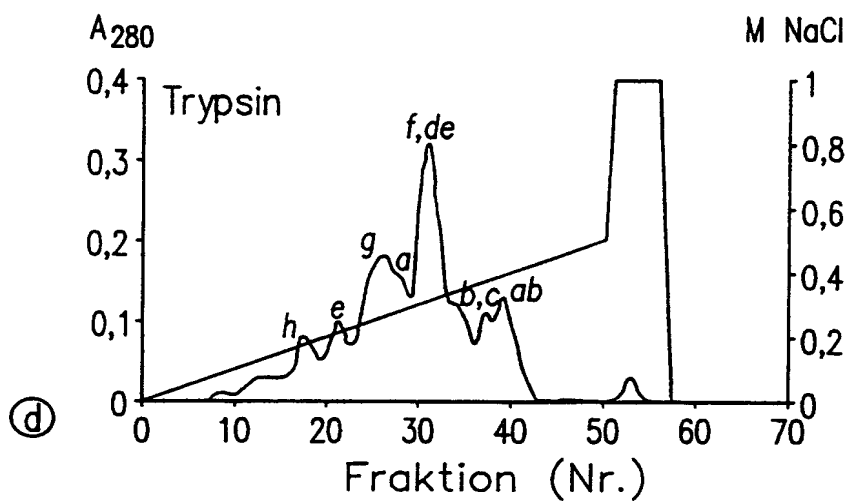






6/29

Fig. 3d-e





7/29  
Figur 4cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des HtH1

## Domäne a

GGCTTGTTCAGTTTCTACTCGTCGCCCTTGTGGCGGGGGCTGGAGCAGACAAACGTCGTCAG  
AAGGACGTCGAGTCACCTCACGGATGACGAGGTGCAAGCTCTCCACGGCGCCCTCCATGAC  
GTCACCTGCATCTACAGGGCCTCTGAGTTTCGAAGACATAACATCTTACCATGCCGCACCAG  
CGTCGTGTGACTACAAGGGACGGAAGATCGCCTGCTGTGTCCACGGTATGCCCAGTTTCCC  
CTTCTGGCACAGGGCATATGTCGTCCAGCCGAGCGGGCACTGTTGTCCAAACGGAAGACT  
GTCGGAATGCCTTACTGGGACTGGGACGCAACGCTGACTCACTTACCATCTCTTGTGACTG  
AACCCATCTACATTGACAGTAAAGGTGGAAAGGCTCAAAACCTACTACTGGTACCGCGGGGA  
GATAGCGTTTCATCAATAAGAAGACTGCGCGAGCTGTAGATGATCGCCTATTCGAGAAGGTG  
GAGCCTGGTCACTACACACATCTTATGGAGACTGTCTCGACGCTCTCGAACAGGACGAAT  
TCTGTAAATTTGAATCCAGTTTCGAGTTGGCTCATAATGCTATCCATTACTTGGTTGGCGG  
TAAATTTGAATATTCAATGTCAAACCTTGGGAATACACCTCCTACGACCCCATCTTCTTCCTC  
CACCACCTCCAAAGTTGACCGCCTCTTCGCCATCTGGCAGCGTCTTCAGGAACCTGCGAGGAA  
AGAATCCCAATGCAATGGACTGTGCACATGAACTCGCTCACCAGCAACTCCAAACCTTCAA  
CAGGGACAGCAATCCAGTCCAGCTCACAAAGGACCACTCGACACCTGCTGACCTCTTTGAT  
TACAAACAACCTTGGATACAGCTACGACAGCTTAAACCTGAATGGAAATGACGCCAGAACAGC  
TGAAAAACAGAACTAGACGAACGCCACTCCAAAGAAGGTGCGTTTGCAAGCTTCCGACTCAG  
TGGCTTTGGGGGTTCTGCCAACGTTGTTGTCTATGCATGTGTCCCTGATGATGATCCACGC  
AGTGATGACTACTGCGAGAAAGCAGGCGACTTCTTCATTCTTGGGGGTCAAAGCGAAATGC  
CGTGGAGATTCTACAGACCCTTCTTCTATGATGTAAGTGAAGCGGTACATCACCTTGGAGT  
CCCGCTAAGTGGCCACTACTATGTGAAAACAGAACTCTTCAGCGTGAATGGCACAGCACTT  
TCACCTGATCTTCTTCTCAACCAACTGTTGCCTACCGACCTGGGAAAG

## Domäne b

GTCACCTTGACCCACCTGTGCATCATCGCCACGATGACGATCTTATTGTTGAAAAAATAT  
AGATCATTTGACTCGTGAAGAGGAATACGAGCTAAGGATGGCTCTGGAGAGATTCCAGGCC  
GACACATCCGTTGATGGGTACCAGGCTACAGTAGAGTACCATGGCCTTCTGCTCGTTGTC  
CACGACCAGATGCAAAAGTCAGGTTTCGCCTGTTGTATGCATGGCATGGCATCCTTCCCTCA  
CTGGCACCGGCTGTTTCGTTACCCAGGTGGAAGATGCTCTTGTACGGCGTGGATCGCCTATC  
GGTGTTCCTTATTGGGACTGGACAAAACCTATGACTCACCTTCCAGACTTGGCATCAAATG  
AGACGTACGTAGACCCGTATGGACATACACATCATAATCCATTCTTCAATGCAAAATATATC  
TTTTGAGGAGGGACACCATCACACGAGCAGGATGATAGATTGAAACTGTTTGCCCCAGTC  
GCTTTTGGGGAGCATTCCCATCTGTTTGATGGAATCCTGTACGCATTTGAGCAGGAAGATT  
TCTGCGACTTTGAGATTCACTTTGAGTTAGTCCATAATTCTATTTCATGCGTGGATAGGCGG  
TTCCGAAGATTACTCCATGGCCACCCTGCATTACACAGCCTTTGACCCCATTTTCTACCTT  
CATCATTCCAATGTCGATCGTCTATGGGCAATCTGGCAAGCTCTTCAAATCAGGAGACACA  
AGCCATATCAAGCCCACTGTGCACAGTCTGTGGAACAGTTGCCAATGAAGCCATTTGCTTT  
CCCATCACCTCTTAACAACAACGAGAAGACACATAGTCATTTCAGTCCCGACTGACATTTAT  
GACTACGAGGAAGTGTCTGCACTACAGCTACGATGATCTAACGTTTGGTGGGATGAACCTTG  
AAGAAATAGAAGAAGCTATACATCTCAGACACAGCATGAACGAGTCTTCGCGGGATTTCT  
CCTTGCTGGAATAGGAACATCTGCACTTGTGTGACATTTTCATAAATAAACCGGGGAACCA  
CCACTCAAAGCTGGAGATATTGCCATTCTTGGTGGTGCCAAGGAATGCCTTGGGCGTTTG  
ACCGCTTGTATAAGGTGGAATAACTGACTCATTGAAGACACTTTCTCTCGATGTGATGG  
AGATTATGAAGTCACTTTTAAATTCATGATATGCACGGAAACGCTCTTGATACGGACCTG  
ATTCCACACGCAGCAGTTGTTTCTGAGCCAGCTCACC



8/29

## Intron b/c

GTAAAGTAAATTTACAAATTTGGTGTCTCTAACTATCCTAAGTATTCAATCGTTAGCGTG  
TACCTATCTGCATAATGCAATACCCTGACTCCATATAAGTATAGTATATTTACTCTGGTCG  
AAACCAACCAATTTGAAAACAAGAGTGGACGTGCTGTTATGATTTCTTTTTCATTCTTGGT  
TCGTTGTGTAATGCCACAGCCAGCAATTCAGATATATAGCGACGGTCTATGAATACTCCA  
GTCTGGACCAGACAATCGTGTGGAATGGTTTAGGCACATTATATCAAATTCATTGTTGAAG  
ATATGAGTTATGAGGTCACAATGTTGTCTTGTACCCCGTGTCAAGTAGTGACGTCAATTTCA  
TGACTGAATCTCTTCAACGCCGTTTAGCAATAATAGGCTCAGTAGTATTCAACCAATTAC  
AATCAGTAGAAAATTCTCTATACTATTCTTATGTTGCATCCTGATATCCCTATGCAAAAT  
TAGTCATCTAATAATAATCATTTTCGATAAATACTTTGGGCAACAAATCAATGTAAACATCT  
ATTTTCTTTTCAG

## Domäne c

CTACCTTTGAGGATGAAAAGCACAGCTTACGAATCAGAAAAAATGTGACAGCTTGACTCC  
TGAAGAAACAAATGAACTGCGTAAAGCCCTGGAGCTTCTTGAAAATGATCATACTGCAGGT  
GGATTCAATCAGCTTGGCGCCTTCCATGGAGAGCCTAAATGGTGGCCTAATCCTGAAGCGG  
AGCACAAGGTTGCATGCTGTGTTTCATGGCATGGCTGTTTTCCCTCATTTGGCACAGGCTTCT  
TGCTCTCCAGGCGGAGAATGCTCTTAGAAAGCATGGGTACAGTGGTGTCTTACCATACTGG  
GATTGGACTCGCCCCCTTTCCCAACTTCCTGATCTGGTTAGTCATGAGCAGTATACAGATC  
CTTCCGACCATCACGTGAAGCATAAACCCTGGTTCAATGGCCACATCGATACAGTAAATCA  
GGATACCACCAGAAGCGTACGGGAGGATCTTTATCAACAACCTGAATTTGGACATTTTCAG  
GATATTGCTCAACAAGTCTCTTAGCATTAGAACAAGATGACTTCTGTTCTGTTTGAAGTGC  
AGTATGAGATTTCCCATAAATTTTATCCATGCACTTGTAGGAGGAACCGACGCTTATGGCAT  
GGCATCGCTGAGATATACAGCATACGATCCAATCTTTTTCTTGCATCATTCAAACACCGAC  
AGGATCTGGGCTATTTGGCAATCCCTGCAAAAATACAGAGGCAAACCGTACAACACTGCCA  
ACTGCGCCATAGAATCTATGAGAAGGCCCCCTGCAACCATTGGACTAAGCAGTGCCATTAA  
CCCTGACAGAATCACCAGAGAGCATGCTATCCCGTTTGATGTCTTCAACTATAGAGATAAC  
CTTCATTACGTATATGATACCCTGGAATTTAATGGTTTGTGCGATTTCACAACCTTGATAGAG  
AGCTGGAAAAAATCAAGAGTCACGAAAGAGTATTTGCTGGATTCTTGCTGTGCGGGATTAA  
AAAATCTGCTCTTGTGAAATTCGAAGTTTGTACTCCACCTGATAATTGTCAATAAGCAGGG  
GAGTTTTATCTACTCGGGGACGAAAACGAGATGGCTTGGGCCTATGACCGACTTTTCAAGT  
ATGATATTACTCAGGTTCTGGAAGCAAACCATCTACACTTCTATGATCATCTCTTCATTCC  
CTACGAAGTCTTTGATCTTAAAGGAGTGAGTTTGGGAAGTACCTGTTCCACACTGCAAAAT  
GTGGTACATGATTCCGGCACAG

## Intron c/d

GTACGTGGATTTGATTACATAGCAATGCTATATGATTTAGTAATTACAACCTCAAGTCAT  
GTAGCCGTTTTAGATTGCATTACATCAAACAGCATTGGATTAAATTTGGGGGATTGTCCAGG  
CCGCATTATGTTGCATTCCGAAAATAGTTTGTGTCCAGTGTCCACGTTTAAALATTAAACCA  
TTTTAATCATATTAGGGATAATTTTAAATAGATCTTATAGTGCTTTATTTTCATATTGTTACA  
GTGGACAGTCACCAAGGACATATTTTACTCTATAGATACACAAACACCAATTAAAACCCCTG  
CTTTGGAAAGTCTAACTTTTCCCCACAG

## Domäne d

GCACCCGTGATCGTGATAACTACGTTGAAGAAGTTACTGGGGCCAGTCATATCAGGAAGAA  
TTTGAACGACCTCAATACCGGAGAAATGGAAAGCCTTAGAGCTGCTTTCCTGCATATTTCAG  
GACGACGGAACATATGAATCTATTGCCAGTACCATGGCAAACAGGCAAAATGTCAATTGA  
ATGATCATAATATTGCGTGTGTGTCCATGGTATGCCTACCTTCCCCCAGTGGCACAGACT  
GTATGTGGTTTCAGGTGGAGAATGCTCTCCTAAACAGGGGATCTGGTGTGGCTGTTCCCTTAC



9/29

TGGGAGTGGACTGCTCCCATAGACCATCTACCTCATTTCATTGATGATGCAACATACTTCA  
ATTCCCGACAACAGCGGTACGACCCCTAACCCCTTCTTCAGGGGAAAGGTTACTTTTGAAAA  
CGCAGTCACAACAAGGGGACCCACAAGCGGGCTCTTCAACTCAGATTATATGTATGAGAAT  
GTTTTACTTGCACCTGGAGCAGGAAAAATTATTTGTGACTTTGAAATTCAGTTTGAGCTTGTTC  
ATAACGCACTTTCATTCCCATGCTGGGAGGTAAGGGCAGTACTCCATGTCCTCCCTGGACTA  
TTCTGCGTTTGATCCCGTCTTCTTCTACATCATGCCAACACGGACAGACTGTGGGCAATC  
TGGCAGGAACACTACAAAGATTCCGAGAACTGCCTTATGAAGAAAGCGAACTGTGCAATCAACC  
TCATGCATCAACCACTGAAGCCGTTTCACTGATCCACATGAGAATCACGACAATGTCACTTT  
GAAATACTCAAAACCACAGGACGGATTTCGACTACCAGAACCACTTCGGATACAAGTATGAC  
AACCTTGAGTTCCATCCTTATCTATCCCAAGTCTTGATGCTACCCCTGAAGCAAAGGAGAA  
ATCACGACAGAGTGTGTTGCGGGCTTCCTTCTTCATAACATAGGAACCTTCTGCTGACATAAC  
TATCTACATATGCTGCTGACGGACGGCGTGGCAATGACTGCAGTCATGAGGCGGGAACA  
TTCTATATCCTCGGAGGGCGAAACAGAGATGCCTTTTATCTTTGACCGTTTGTATAAATTTG  
AAATCACCAAAACCACTGCAACAGTTAGGAGTCAAGCTGCATGGTGGAGTTTTTCGAACTGGA  
GCTTGAGATCAAGGCATACAACGGTTCCTATCTGGATCCCCATACCTTTGATCCAACTATC  
ATCTTTGAACCTGGAACAG

Intron d/e

GTAATGCCATCTTAATACAGTTTCGTTTCGTTAAATTATATATGTTTCGTTTACAACACCATAC  
CTTGAATTGAGGTAATACATCACTTGATATTGATATGTAATGGTAATTGTTCTTGTGTTGT  
AAAACCGTTTCTGGGGTGTGTTATTCATCTCCACCTGGTGGATAGTGAGTAAACACATTG  
GTTTAATATGGGTATCTAATGGACAGTGAAGTGTGCTGGCTAGGCAGATACCTTGSTTTCT  
GTGAATGGAGGTAGTAGAAAGGGGTTTTTGATGATTGCAG

Domäne e

ATACCCATATCTTGGACCACGACCATGAGGAAGAGATACTTGTTCAGGAAGAATATAATTGA  
TTTGAGCCCAAGGGAGAGGGTTTCTCTAGTCAAAGCTTTGCAAGAATGAAGAATGATCGC  
TCCGCTGATGGGTACCAAGCCATTGCCTCTTTCCATGCCCTGCCACCACTCTGTCCCAATC  
CATCTGCAGCTCACCGTTATGCTTGCTGTGTCCATGGCATGGCTACATTTCCCCAGTGGCA  
CAGACTGTACACTGTTTCAGGTTTCAGGATGCCCTGAGGAGACATGGTTCACTTGTTGGTATT  
CCTTACTGGGACTGGACAAAACCACTCAACGAGTTACCCGAGCTTCTTTCTTCAGCPACAT  
TTTATCATCCAATCCGGAATATTAATATTTCAAATCCATTCCTCGGGGCTGACATAGAATT  
TGAAGGACCGGGCGTTTCATACAGAGAGGCACATAAATACTGAGCGCCTGTTTCACAGTGGG  
GATCATGACGGATACCAAACTGGTTCTTCGAAACTGTTCTCTTTGCTTTGGAACAGGAAG  
ATTACTGCGATTTTTGAATACAATTTGAGATAGCCCATATATGGCATCCACACATGGATTGG  
TGGAAAGCGCAGTATATGGCATGGGACACCTTCACTATGCATCATATGATCCAATTTTCTAC  
ATCCACCATTTCACAGACGGACAGAAATATGGGCTATTTGGCAAGAGCTGCAGAAGTACAGGG  
GTCTATCTGGTTTCGGAAGCAAACCTGTGCCATTGAACATATGAGAACACCCTTGAAGCCTTT  
CAGCTTTGGGGCCACCCTACAAATTTGAATAGTCATACGCAAGAATATTCAAAGCCTGAGGAC  
ACGTTTGACTATAAGAAGTTTGATACAGATATGATAGTCTGGAATTGGAGGGGCGATCA  
TTTCTCGCATTGATGAACCTTATCCAGCAGAGACAGGAGAAAGACAGAACCTTTGACAGGGTT  
CCTCCTTAAAGGTTTTTGGTACATCCGCACTCTGTGTCATTGCAAGTTTGCAGAGTTGATCAC  
ACCTGTAAAGATGCGGGCTATTTCACTATTCTGGGAGGATCAGCCGAAATGCCATGGGCAT  
TCGACAGGCTTTATAGTATGACATTACTAAAACCTTTCACGACATGAACCTGAGGCACGA  
GGACACTTTCTCTATAGACGTAACCTATCAGCTCTTACAATGGAACAGTACTCTCGGGAGAC  
CTCATTCAGACGCCCTCCATTATATTTGTACCTGGACGCC

Intron e/f

GTGAGTACCTGTTTGCACCTAAGACTTCGTAGGCTAAAGTGTAAGAAATATCAATTAATT  
TCAATTCACCCAAACTTGAAAACGGTACCTATATAGGTTAACTTTTTGTCTACAGTAACT  
GAACATACCTACACATTTTCATGAATGATCTCTCAATATTTTCCACCAACAG





10/29

## Domäne f

ATAAACTCAACTCACGGAAACATACACCTAACAGAGTCCGCCATGAGCTAAGTAGCCTTAG  
TTCCCGTGACATAGCAAGCTTGAAGGCAGCTTTGACAAAGCCTTCAACATGATAATGGGACT  
GATGGTTATCAAGCTATTGCTGCCTTCCATGGCGTTCTGCGCAGTGCCACGAGCCATCTG  
GACGTGAG

## Intron f(1)

GTAAATTTACAGAGCTTTATGAAGTGTGTTTCAGAGTGAAGAGACCAAGATATACTTTATACC  
CAAACTAGCTAGCAACAGACGATTTCACTTGTTCGGACACTTTGTATTATACGTTGGAT  
CCCAAGGTAAACGGAAACGTAACCGAGAATCAGTCCGTAAAGTGAGTGAGTGAGTTTGGGG  
CTTAACCTCGCACTCAGCAATACCCAGCTATGTGGCGACTCTCAGATTTACTGCTGGAGG  
AGAACCTACATAGCCCGGTTTAACCCGTGTGGTATGTAGTAAGACCAGCGCGGCATGGGCTG  
GTATCTGACGGACGAAGGGTGGCGCTGCACGTATTCCAGTGGTACAACACTGCACCCCAAT  
TTCACCGACCGGAGAATGATCTCCCTTCGGAGATATCGCCTGCCTTCCACGGGATTTCGA  
ACTCGGTGACCTTCAAGCCAGCGCGCTTCTAGCGGGGGCGATTAGAGGTTNAAGGCCGACG  
GCTCTACCACCTTAACTATCCCCCGGCCCACTCCTGAAGGAATGTTTATAATTCAGCCT  
TTGTTTTCTTATTAAACACTCTTGGCAGATTTTCTATAGATAATGGATTACATGTAGACA  
GTCTCCCATTTGTTGTAAGTGGTAGTCAAGAGTTAGAATCTGAATACATTCTCCAAGATGGA  
TCAAGGAAAACAATAATTACTTGATGTTGCAG

## Domäne f(2)

ATCGCCTGTTGCATCCACGGCATGGCGACGTTTCTCCTCACTGGCACCGGTTGTACACTCTGC  
AGTTGGAGCAAGCGCTGCGCAGACACGGGTCCAGTGTTGCTGTTCCATACTGGGACTGGAC  
CAAGCCAAATCACCGAACTGCCACACATTCTGACAGACGGAGAATATTATGACGTTTGGCAA  
AATGCCGTCTTGGCCAAATCCGTTTGCAAGAGGTTATGTGAAAATTAAAGATGCATTTACGG  
TGAGAAATGTCCAGGAAAGTCTGTTCAAAATGTCAAGTTTTGGAAAGCACTCGCTTCTGTT  
TGACCAGGCTTTGTTGGCTCTTGAACAACTGACTACTGTGACTTCGAAGTTCAGTTTGAA  
GTGATGCATAACACGATCCATTATCTCGTAGGAGGGCGTCAACGTACGCCTTCTCCTCTC  
TCGAGTATTCCTCATAACGATCCAATCTTCTTTATTCAACCACTCGTTTTGTTGACAAAATATG  
GGCTGTATGGCAAGAACTGCAAAGCAGGAGACATCTACAGTTTAGAACAGCTGATTGTGCT  
GTGGGCCTCATGGGTGAGGCAATGAGGCCTTCAACAAGGATTTCAACCACAACCTCGTTCA  
CCAAGAAGCACGCAGTCCCTAATACAGTATTTGATTATGAAGATCTTGGCTATAACTATGA  
CAACCTTGAAATCAGTGCTTTAACTTAAATGAGATCGAGGCGTTAATAGCAAAACGCAAG  
TCACATGCTAGAGTCTTTGCTGGGTTCCTGTTGTTTGGATTAGGAACTTCGGCTGATATAC  
ATCTGGAAATTTGCAAGACATCGGAAAACCTGCCATGATGCTGGTGTGATTTTTCATCCTTGG  
AGGTTCTGCAGAGATGCATTGGGCATACAACCGCCTCTACAAGTATGACATTACAGAAGCA  
TTGCAGGAATTTGACATCAACCCTGAAGATGTTTTCCATGCTGATGAACCATTTTTCTCTGA  
GGCTGTGCGTTGTTGCTGTGAATGGAACCTGTCATTCCATCGTCTCATCTTCACCAGCCPAC  
GATAATCTATGAACCAGGCGAAG

## Intron f/g

GTGAGATATATGCAAATTGAATGTTGTCCAGATGCGTTGTTTACATTTATATGCTTGGAAAT  
TGTCTGAAACGAATACAGTGGAAATAACCAAAAGCTGAAAATATAAAAGATATATACTTCAT  
TCTGAATTTGTGAGTATTGCTGACCCAAAAACACGTTATCCATGTCGACACTATATTTGCC  
TTTCTGAATCTGAGAOTGCGTTATGTTTCTAATAATCACGAAATATGGTATACAGGTTGTG  
TATCTGTAGAATACCCAAGGCAGAAATTTAAAGGGTCACACCCTGTTTAATACAG



11/29

## Domäne g(1)

ATCACCATGACGACCATCAGTCGGGAAGCATAGCAGGATCCGGGGTCCGCAAGGACGTGAA  
CACCTTGACTAAGGCTGAGACCGACAACCTGAGGGGAGGCGCTGTGGGGTCTCATGGCAGAC  
CACGGTCCCAATGGCTTTCAAGCTATTGCTGCTTTCCATGGAAAACAGCTTTGTGTCCCA  
TGCCTGATGGCCACAACACTACTCATGTTGTACTCACGGCATGGCTACCTTCCCACACTGGCA  
TCGCCTCTACACCAAGCAGATGGAGGATGCAATGAGGGCGCATGGGTCTCATGTGGGCTG  
CCCTACTGGGACTGGACTGCTGCCTTCACCCACCTGCCAACACTGGTCACCGACACGGACA  
ACACCCCTTCCAACAT

## Intron g(2)

GTAAGAGCGGGGTAGGGATGGGGTGGTAGGGGGTGGGTTGTTCTATTACTTCCCGCTTCAC  
TTGTATGAAATGGATAACCTTGGCTGCATCCCAATTGCGTGATCGATTCTCTTTTCGATTCA  
CTCGTGCGATTAGACTGCCTTATTTACTATAGTAGTTAGAATGTTGCTCAGTGCGCCGTTA  
AACAACTAATACACAAAACCGCATTTGTTTTATATGGTCACTCTACTGTTTATCACGTATA  
TGTATGTTCCGACTCACTGGTTGGTGGCTACCATTTCTACTGTCACACTGAGAGCCAAATGTT  
CTCAGATGTGTGAATGTTTGAAGCGCGTTTCTACATAATATTGCAGGAATACCATTGTAG  
AATGTAGTCAAAACAGGTAACAATCTGTTAGTGAGCCAGTTTCGAGGTTGCGTTGTAGGGTG  
TAGTCCAAACAGGTAGGCAGTCCATAAGCATAGTTTTTAAGCATTTTAGATCATCTATAATT  
AACCACATGGTTAGCCGCTATGTTTAGTTTAAATCCAGTATAAGTTAGAACTGTTATATTTT  
GAAGGGAAGTGAGTAAATCCTTATTCCTTGACTACCATTTAATAGATTTCCCAATGACTCC  
ATTCAACTCCTAATTTTACATCACTGCTCTCTTCAACAG

## Domäne g(2)

GGACACATTGATTATCTCAATGTCAGCACAACTCGATCTCCCCGAGACATGCTGTTCAACG  
ACCCCGAGCATGGATCAGAGTCGTTCTTCTACAGACAAGTCCTCTTAGCTCTGGAACAAC  
TGATTTCTGCAATTCGAAGTTCAGTTTGAGATAACCCACAATGCCATCCATTCTCTGGACA  
GGTGGCCACAGCCCCCTACGGAATGTCCACTCTCGACTTCACTGCCTACGATCCTCTCTTCT  
GGCTTCACCACTCCAACACCGACAGAATCTGGGCTGTCTGGCAAGCTTTGCAAGAATACAG  
AGGACTTCCATACAAACATGCCAATTGTGAGATCCAGGCAATGAAAACGCCCTGAGGCCT  
TTCAGTGACGATATCAACCACAACCCAGTCACAAAGGCTAACGCGAAGCCATTAGATGTGT  
TCGAGTATAATCGGTTGAGCTTCCAGTACGACAACCTCATCTTCCATGGATACAGTATTCC  
GGAACCTTGATCGCGTGCTTGAAGAAAGAAAGGAGGAGGACAGAATATTTGCTGCCTTCTT  
CTCAGTGGAAATCAAGCGTAGTGCTGATGTAGTGTTCGACATATGCCAGCCAGAACACGAAT  
GTGTGTTTCGCGAGGGACTTTTTCGATTTTGGGAGGGGAGCTAGAAATGCCCTGGTCTCTCGA  
CAGACTGTTCCGCTATGATATCACCAAGGTGATGAAGCAGCTACACCTGAGGCATGACTCT  
GACTTTACCTTCAGGGTGAAGATTGTGGGCACCGACGACCACGAGCTTCTTTCAGACAGTG  
TCAPAGCACCACTATTGAATTTGAACCGGGCG

## Intron g/h

GTGAGTACGACAGGCATTTCTAGTAAAAACCTACTTTTGGTAAAAGGTTTCGAGAAATCACT  
TGAAGCAACAACATGATTTTGTAAAGCCTATTACACGTGAACATGTCACACCCGGTGATGC  
CGTTTAAATGGACATGCCTCTGTTAATGAAGGGGTAAAGTACATGTGTATGGGGATGGGATG  
GGAGCCACCTGTCCCAATTTTCATAGGTCCCTAGGATCCAGTTGCGTAGGAATCCCTGTAT  
TAATGCCTTGTGAATTCCTCCCTGGAATTGTCCTGGGCCAATTTTACAAACCCGCCCGCA  
TATACCTTGGAAATTAATGGGCCTAAGGGTGGGGCTTTAAGGACCAAGAACCCCAACCTAA  
ACCCCAACCCATTTTTCACCCCATTCAGGTTTGTGTTTACCAAAATAAAAGGTTTCCA  
CTTTGAGGAAACCTTTAAGGGTCTTTTCAGGGCTTTTTTCTTTTCTGGGAATTCCAAT  
TCCGGGGGAACAAAATACATATATTTACAGACCTTTGGTCAAATTTATATRAATTTCCGAC  
TTCATGTACATAGGTTTGTCTTTCTTCTACACAG



12/29

Domäne h

TGCACAGAGGCGGAAACCACGAAGATGAACACCATGATGACAGACTCGCAGATGTCCTGAT  
CAGGAAAGAAGTTGACTTCCTCTCCCTGCAAGAGGCCAACGCAATTAAGGATGCACTGTAC  
AAGCTCCAGAATGACGACAGTAAAGGGGGGCTTTGAGGCCATAGCTGGCTATCACGGGTATC  
CTAATATGTGTCCAGAAAGAGGTACCGACAACTATCCCTGCTGTGTCCACGGAATGCCCGT  
GTTCCCCCACTGGCACC GCCTGCATACCATTCAGATGGAGAGAGCTCTGAAAAACCATGGC  
TCTCCAATGGGCATTCCCTTACTGGGATTGGACAAGAAGATGTGAGTCTTCCATCTTTCT  
TTGGAGATTCCAGCAACAACAACCCCTTTCTACAAATATTACATCCGGGGCGTGCAGCAGCA  
AACPAACCAGGGACATTAATCAGAGACTCTTTAATCAAACCAAGTTTGGTGAATTTGATTAC  
CTATATTACCTAACTCTGCAAGTCCTGGAGGAAACTCGTACTGTGACTTTGAAGTTCAGT  
ATGAGATCCCTCCATAACGCCGCTCCACTCCCTGGCTTTGGAGGAAGTGGAAAGTATTCATGTC  
TACCCCTGGAGCATTCGGGCTTTGACCCCTGTCTTCATGATTCACCACTCGAGTTTGGATAGA  
ATCTGGATCCCTTTGGCAGAAGTTGCAAAAGATAAGAATGAAGCCTTACTACGCATTGGATT  
GTGCTGGCGACAGACTTATGAAAGACCCCTGCATCCCTTCAACTACGAAACCGTTAATGA  
AGATGAATTCACCCGCATCAACTCTTTCCCAAGCATACTGTTTGACCACTACAGGTTCAAC  
TATGAATACGATAACATGAGAATCAGGGGTCAGGACATACATGAACCTGAAGAGGTAATTC  
AGGAATTAAGAAACAAAGATCGCATATTTGCTGGTTTTGTTTTGTGCGGGCTTACGGATATC  
AGCTACAGTGAAAGTATTCATTTCATTCGAAAAACGATACAAGTCACGAAGAATATGCAGGA  
GAATTTGCAGTTTTTGGGAGGTGAGAAGGAGATGCCGTGGGCATATGAAAGAATGCTGAAAT  
TGGACATCTCCGATGCTGTACACAAGCTTCACGTGAAAGATGAAGACATCCGTTTTAGAGT  
GGTTGTTACTGCCTACAACGGTGACGTTGTTACCACCAGGCTGTCTCAGCCATTTCATCGTC  
CACCGTCCAGCCCATGTGGCTCACGACATCTTGGTAATCCCAGTAGGTGCGGGCCATGACC  
TTCCGCCTAAAGTCGTAGTAAAGAGCGGCACCAAGTCGAGTTTACACCAATAGATTGCTC  
GGTGAACAAAGCAATGGTGGAGCTGGGCAGCTATACTGCTATGGCTAAATGCATCGTTCCC  
CCTTTCTCTTACCACGGCTTTGAACTGGACAAAGTCTACAGCGTCGATCACGGAGACTACT  
ACATTGCTGCAGGTACCCACGCGTTGTGTGAGCAGAACCTCAGGCTCCACATCCACGTGGA  
ACACGAGTAG

3'UTR

TTCACAG

Intron UTR

GTGAGGAGAAGGCCCCAGGCTAGCAGGGCAATGGATGAAGGAAATAGGGGCAAAGGGAATA  
GCAGTTACACCATCGACATTTCCAACCTCCTCAGAACTAATATATAGCCTTAATACAACC  
AGCCAAAGACTCAACGGGCAGCCGGGGTGGGGGGATTTGGTGGTCGCTGTTTCAGACCAGGG  
TGCAAAATATCAGTGCGCAAATCAACATGTTGCGTGTGAGACACTGACACAGCAGTCATTG  
AACCTGCAGACCCATAACAGGAAAATGGGGCAGATACGATCAAAGACAGTGTAATAATAGGG  
ATAAGTAGGCATATGCAACCACCTGATGGAAATGAAAAGGGGTAAGTTTAAACCCCGGCTA  
CCAAAGGTCCAAATGGTTCCCTTAACCCAGCTTACGCTATCCCTCTAATTTTCAGTATTGAGCT  
GATTTCTGTGAGTTTCATGTAACTGTATACCTTTCTGTATTATTACAG

3'UTR

GTTGCTATGCCGACTGCGCTATATTGGTGAACGAGACGATGAGGACATCTCTGAAAGAGTT  
CGCCAAAGTGATGTGTAGGTCACGGAAGTATTGTTGAGCTAACAATATGATGATTTCAAAT  
GACTTGGCGCTCTAGGACAAAGACATATTTCATCAGCACCCCTGTGCACCAACTCTTTGTTT  
GCTGCAAAACGTCTGACAAAGCGACACGTCAATCAACAAGCTGTTCAAACCTCAAGTGGATGTA  
ACTAGAATCGTTGGGCCATCGTTCACAAAGTATTGACAGATGTCACACATGATGGCGAGAA  
ACACTTTAGAACTTTTAAATGACCTAGAGTGACTTGTAATATGTAATATATTTCTTCAAG  
ACTCAGCTGAACATATTGTTGGATAACACATCAATTCCTCAACAAATGCTTTATCTTCAC  
ATGGATGTATGTAATGTGGCCCGCAATAAAGTATATATATGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
A



13/29

Figur 5

Abgeleitete Primärstruktur des HtH1

## Signalpeptid

LVQFLLVALVAGAGA

## Domäne a

DNVVRKDVSHLTDDDEVQALHGALHDVTASTGPLSFEDITSYHAAPASCDYKGRKIACCVHG  
MPSFPFWHRAYVVQAEARALLSKRKTVGMPYWDWTQTLTHLPSLVTEPIYIDSKGGKAQTNV  
WYRGEIAFINKKTARAVDDRLFEKVEPGHYTHLMETVLDALQDEFCKFEIQFELAHNAIH  
YLVGGKFEYSMSNLEYTSYDPIFFLHRSNVDRLFAIWQRLQELRGKNPNAMDCAHELAHOQ  
LQPFNRDSNPVQLTKDHSTPADLFDYKQLGYSYDSLNLNGMTPEQLKTELDERHSEKRAFA  
SFRLSGFGGSANVVVYACVPDDDDPRSDDYCEKAGDFFILGGQSEMPWRFPYRPFYDVTAV  
HRLGVPLSGHYVVKTELFVNGTALS PDLLPOPTVAYRPGK

## Domäne b

GHLDPVHHRHDDDLIVRKNIDHLTREEEYELRMALERFQADTSVDGYQATVEYHGLPARC  
PRPDAKVRFACCMHGMASFPHWHRLFVTOVEDALVRRGSPIGVPYWDWTKPMTHLPDLASN  
ETYVDPPYGHTHRNPFNANISFEEGHHHTSRMIDSKLFAPVAFGEHSHLFDGILYAFEQED  
FCDFEIQFELVENSIAHWIGGSSEDYSMATLHYTAFDPIFYLHHSNVDRLWAIWQALQIRRH  
KPYQAHCAQSVEQLPMKPFAPSPPLNNEKTHSHSVPTDIYDYEEVLHYSYDDLTFGGMNL  
EEIEEAIHLRQCHERVFAGFLLAGIGTSALVDIFINKPGNQPLKAGDIAILGGAKEMPWAF  
DRLYKVEITDSLKTLSLDVDGDYEVTFKIHDHMGNALDLDLIPHAADVSEPAH

## Domäne c

PTFEDEKHSRLRIRKNVDSLTPREETNELRKALELLENDHTAGGFNQLGAFHGEPKWCNPPEA  
EHKVACCVHGMVFPWHRLALQAEANALRKHGYSYGALPYWDWTRPLSOLPDLVSHEQYTD  
PSDHHVKHNPWFENGHIDTVNQDTRSVREDLYQQPEFGHFTDIAQQVLLALEQDDFCSEV  
QYEISENFIHALVGGTDAYGMASLRYTAYDPIFFLHNSNTDRIWAIWQSLQKYRGKPYNTA  
NCAIESMRRPLQPFGLSSAINPDRI TREHAIPFDVFNRYRDNLHYVYDTLEFNGLSISQLDR  
ELEKIKSHERVFAGFLLSGIKKSALVKFEVCTPPDNCHKAGEFYLLGDENEMAWAYDRLFK  
YDITQVLEANHLEFYDHLFIRYEVFDLKGVS LGTDLPHTANVVHDSGT

## Domäne d

GTRDRDNYVEEVTGASHIRKNLNDLNTGEMESLRAAFLHIQDDGTYESIAQYHGKPGKCQL  
NDHNIACCVHGMPTFPQWHRLYVVQVENALLNRGSGVAVPYWEWTAPIDHLPHFIDDATYF  
NSRQQRYPNPFFRGKVT FENAVTTRDPQAGLFNSDYMYENVLLALEQENYCDFEIQFELV  
HNALHSM LGGKGQYSMSLDYSAFDPVFFLHHANTDRLWAIWQELQRFRELPEEANCAN  
LMHQPLKPFSDPHENHDNVTLYSKPQDGFYQNHFGYKYDNLEFHLSIPSLDATLQKRR  
NHDRVFAGFLLHNI GTSADITIYICLPDGRRGNDCSHEAGTFYILGGGETEMPFIFDRLYKF  
EITKPLQQLGVKLHGGVFELELEIKAYNGSYLDPHTFDPTIIFEPGT

## Domäne e





14/29

DTHILDHDHEEEILVRKNIIDLSPRERVSLVKALQRMKNDRSADGYQAIASFHALPPLCPN  
PSAAHRYACCVHGMATFPQWHRLYTVQVQDALRRHGSLVGI PYWDWTKPVNELPELLSSAT  
FYHPIRNINISNPFLGADIEFEGPGVHTERHINTERLFHSGDHDGYHNWFFETVLFALQE  
DYCDFEIQFEIAHNGIHTWIGGS AVYGMGHLHYASYDPIFYIHHSQTDRIWAIWQELQYR  
GLSGSEANCAIEHMRTPLKPFSFGPPYNLNSHTQEYSKPEDTFDYKKFGYRYDSLELEGRS  
ISRIDELIQORQEKDRTFAGFLLKGFGTSASVSLQVCRVDHTCKDAGYFTILGGS AEMPWA  
FDRLYKYDITKTLHDMNLRHEDTFSIDVTITSYNGTVLSGDLIQTPSIIFVPCR

Domäne f

HKLNSRKHTPNRVRHELSSLSRDIASLKAALTSLQHDNGTDGYQAI AAFHGVPAQCHEPS  
GREIACCIHGMATFPHWHRLYTLQLEQALRRHGSSVAVPYWDWTKPITELPHILTDGEYYD  
VWQNAVLANPFARGYVKIKDAFTVRNVQESLFKMSSFGKHSLLFDQALLALEQTDYCDFEV  
QFEVMHNTIHYLVGGRQTYAFSSLEYSSYDPIFFIHHSFVDKIWAVWQELQSRRLQFRTA  
DCAVGLMGQAMRPFNKDFNHSFTKKHAVPNTVFDYEDLGYNYNLEISGLNLNEIEALIA  
KRKSHARVFAGFLLFGLGTSADIHLEICKTSENCHDAGVIFILGGS AEMHWAYNRLYKYDI  
TEALQEFDINPEDVFADEPFFLRLSVVAVNGTVIPSSHLHQPTIIEYEPGE

Domäne g

DHHDDHQSGS IAGSGVRKDVNTLTKAETDNLREALWGV MADHGPNGFQAI AAFHGKPALCP  
MPDGHNYSCCTHGMATFPHWHRLYTKOMEDAMRAHGSHVGLPYWDWTAAFTHLPTLVTDTD  
NNPFQHGHI DYLVNSTTRS PRDMLFNDPEHGSESFYRQVLLALEQTD FCKFEVQFEITHN  
AIHSWTGGHSPYGMSTLDFTAYDPLFWLHHSNTDRIWAVWQALQEYRGLPYNHANCEIQAM  
KTPLRPFSDDINHNPNVTKANAKPLDVFEYNRLSFQYDNLI FHGYSIPELDRVLEERKEEDR  
IFAAFLLSGIKRSADVFDICQPEHECVFAGTFAILGGELEMPWSFDRLFRYDITKVMKQL  
HLRHSDFTFRVKIVGTDDHELPSDSVKAPTIEFEPG

Domäne h

VERGGNHEDEHDDRLADVLTIRKEVDFLSLQEANAIKDALYK LQND DSKGGFEAIAGYHGY  
PNMCPERGTDKYPCCVHGMPVFPHWHRLHTIQMERALKNHGSPMGI PYWDWTKKMSSLPSF  
FGDSSNNNPFYKYYIRGVQHETTRDVNQRLFNQTKFGEFDYLYLTLOVLEENS YCDFEVO  
YEILHNAVHWSLGGTGQYSMSTLEYSADFVFMHHSSLDRIWILWOKLQKIRMKPYALD  
CAGDRLMKDPLHFPNYETVNEDEFTRINSFPSILFDHYRFNYEYDNMRIRGQDIHELEEV  
QELRNKDRI FAGFVLSGLRISATVKVFIHKNDSHEEYAGEFAVLGGEKEMPWAYERMLK  
LDISDAVHKLHVKDEDIRFRVVVTAYNGDVVTTRLSQPFIVHRPAHVAHDILVIPVGAGHD  
LPPKVVVKSGTKVEFTPIDSSVNKAMVELGSYTAMAKCIVPPFSYHGFELDKVYSVDHGDY  
YIAAGTHALCEQNLRLHIHVEHE



Figur 6

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des HtH2

## Domäne b

CACAGACTGTTGCTCAGCCAGGTGGAAGATGCTCTGATCAGGCGAGGATCGCCTATAGGGG  
TCCCCTACTGGGACTGGACTCAGCCTATGGCGCATCTCCCAGGACTTGCAGACAACGCCAC  
CTATAGAGATCCCATCAGCGGGGACAGCAGACACAACCCCTTCCACGATGTTGAAGTTGCC  
TTTGAAATGGACGTACAGAACGTCACCCAGATAGTAGATTGTTTGAACAACCTTTATTTC  
GCAAAACATACGCGTCTCTTCGACAGTATAGTCTATGCTTTTGAGCAGGAGGACTTCTGCGA  
TTTTGAAGTTCAATTTGAGATGACCCATAATAATATTACGCGCTGGATTGGTGGCGGCGAG  
AAGTATTCCATGTCTTCTCTACACTACACAGCCTTCGACCCTATCTTCTACCTTCGTCAC  
CCAACACTGACCGGCTCTGGGCAATTTGGCAAGCGTTGCAGATACGAAGAAACAGGCCTTA  
CAAGGCTCATTGTGCTTGGTCTGAGGAACGCCAGCCTCTCAAACCTTTGCGCTTCAGTTCC  
CCACTGAACAAACGAAAAACCTACGAAACTCGGTGCCCCAACAGTTTACGACTACG  
AAGGAGTCTTGGCTATACTTATGATGACCTCAACTTCGGGGGCATGGACCTGGGTCAGCT  
TGAGGAATACATCCAGAGGCAGAGACAGAGAGACAGGACCTTTGCTGGTTTCTTTCTGTCA  
CATATTGGTACATCAGCGAATGTTGAAATCATTATAGACCATGGGACTCTTCATACCTCCG  
TGGGCACTTTGCTGTTCTTGGCGGAGAGAAGGAGATGAAATGGGGATTGACCGTTTGT  
CAAATATGAGATTACAGATGAACTGAGGCAACTTAATCTCCGTGCTGATGATGTTTTACGC  
ATCTCTGTTAAAGTAACTGATGTTGATGGCAGTGAGCTGTCTCTGAACTCATCCCATCTG  
CTGCTATCATCTTCGAACGAAGCCATA

## Intron b/c

GTAAGTAGCTACCTGTTTTATTCAATTTTTTCGCTTTGCCAATCAATTCATTTCAGCTTGAAA  
TTCAATAATTGTGTTTTGCATGGCTGAAAACCAATTTGAACTCTTTTCTTTTCTCAGGTG  
AACTCAAATAAATAATCACTAATTGTTATGCACGCGGGTAGGGCATACTATATCCAC  
ATCGGTCATCTCAAAATGCAACAAATTTGTCTTATTTCCGTTGGGACAAGCAAACCCCTT  
TCCTGTAATCTTGCCTTTGGCATCCACTGGAATTAATGTTGACTGGTAATTGATACTGGCT  
CTCTTCTTGCATAGAGTTAATATCTATAGTTTGTAAATCTTTATGATTTTGCCTATTATAT  
TTGACAGCATGCTATAGACACCCTAGACTATTGTATAGCCACTTGTATTGTTTTCCATT  
TATTATTTATAACAGAACATGGCTTGTAATTTTTTATTTACCTTCCAG

## Domäne c

TTGACCATCAGGACCCGCGATCATGACACAATCATTAGGAAAAATGTTGATAATCTTACACC  
CGAGGAAATTAATTCTCTGAGGCGGGCAATGGCAGACCTTCAATCAGACAAAACCGCGGGT  
GGATTCCAGCAATTGCTGCTTTTACGCGGGGAACCCAAATGGTGCCCAAGTCCCGATGCTG  
AGAAGAAGTTCTCCTGCTGTGTCCATGGAATGGCTGTCTTCCCTCACTGGCACAGACTCCT  
GACCGTGCAAGGCGAGAATGCCCTGAGAAAGCATGGATGTCTCGGAGCTCTCCCTACTGG  
GACTGGACTCGGCCCCCTGTCTCACCTACCTGATTTGGTTTTGCTAAGTAGCAGAACTACAC  
CGATGCCATATTCCACCGTGGAAGCCCGAAACCCCTGGTACAGCGGCCATATTGATACAGT  
TGGTGTGACACACAAGAAGCGTCCGTCAAGAAGCTGTATGAAGCTCCTGGATTTGGCCAT  
TATACTGGGGTTCGCTAAGCAAGTGCTTCTGGCTTTGGAGCAGGATGACTTCTGTGATTTTG  
AAGTCCAGTTTGAGATAGCTCACAATTTCAATTCACGCTCTTGTGCGGCGGAAGCGAGCCATA  
TGGTATGGCGTCACTCCGTTACACTACTTATGATCCAAATTTTCTACCTCCATCATTCTAAC  
ACTGACAGACTCTGGGCTATATGGCAGGCTCTACAAAGTACAGGGGCAAACCTTACAAAT  
CCGCCAACTGCGCCATTGCTTCTATGAGAAAACCCCTACAACCCCTTTGGTCTGACTGATGA  
GATCAACCCCGGATGATGAGACAAGACCATGCTGTTCCCTTTCAGTGTCTTTGATTACAAG  
AACAACTTCAATTATGAATATGACACCCTTGACTTCAACGGACTATCAATCTCCCGATGG  
ACCGTGAAGTGTACGGAGAAAGTCTCATGACAGAGTATTTGCCGGATTTTGTGCTGCATGG



16/29

TATTCAGCAGTCTGCACTAGTTAAATTCTTTGTCTGCAAATCAGATGATGACTGTGACCAC  
 TATGCTGGTGAATTCACATCCTTGGTGATGAAGCTGAAATGCCATGGGGCTATGATCGTC  
 TTTACAAATATGAGATCACTGAGCAGCTCAATGCCCTGGATCTACACATCGGAGATAGATT  
 CTTTCATCAGATACGAAGCGTTTGATCTTCATGGTACAAGTCTTGGAAGCAACATCTTCCCC  
 AAACCTTCTGTCATACATGACGAAGGGGCAG

Intron c/d

GTGAGAACATTGATAATAGTTCAAATGAAAGTATATCCGATTCAAGCTGTGATACAAGATG  
 AGATACATAATCACAATGTTTGTATTAGATATCTCTCTTAATTTAATGCCGCTTTTATCAA  
 TATTCGAGCAATCCTTCAGCAACATACACCAGCAAAATGTTTCATCAACAGACTATATTATT  
 TAATCTTTTAAATCCTTTTCTGTTGTTATAAATACTTAAAGTATCGAATTCCTTGAATG  
 CGTCTTCTCTGCAGCATATAGTTAAGTTGTTGTTGTTCTCTGTCAG

Domäne c

GTCACCATCAGGCTGACGAGTACGACGAAGTTGTAAGTCTGCTGCAAGCCACATCAGAAAGAA  
 TTTAAAGATCTGTCAAAGGGAGAAAGTAGAGAGCCTAAGGTCTGCCTTCCCTGCAACTTCAG  
 AACGACGGAGTCTATGAGAATATTGCCAAGTCCACGGCAAGCCTGGGTTGTGTGATGATA  
 ACGGTCCGAAGGTTGCCTGTTGTGTCCATGGAATGCCACCTTCCCCCAGTGGGCACAGGCT  
 CTATGTCTCCAGGTGGAGAATGCTTTGCTGGAGAGAGGATCTGCCGTCTCTGTGCCATAC  
 TGGGACTGGACTGAAACATTTACAGAGCTGCCATCTTTGATTGCTGAGGCTACCTATTTCA  
 ATTCCTGTCACAAACGTTTGACCCTAATCCTTTCTTCAGAGGTAAATCAGTTTTGAGAA  
 TGCTGTTACAACACGTGATCCCCAGCCTGAGCTGTACGTTAACAGGTACTACTACCAAAAC  
 GTCATGTTGGTTTTTGAACAGGACAACACTACTGCGACTTCGAGATACAGTTTGAGATGGTTC  
 ACAATGTTCTCTCCATGCTTGGCTTGGTGGAAGAGCTACTTATTCTATTCTTCTTGATTA  
 TTCTGCAATTCGACCCCTGTGTTTTTCTTCCATGCGAACACAGATAGATTGTGGGCCATC  
 TGGCAGGAGCTGCAGAGGTACAGGAAGAAGCCATACAAATGAAGCGGATTGTGCCATTAACC  
 TAATGCGCAAACCTCTACATCCCTTCGACAACAGTGATCTCAATCATGATCCTGTAACCTT  
 TAAATACTCAAAACCCACTGATGGCTTGGACTACCAGAACAACCTTGGATACAAGTATGAC  
 AACCTTGAGTTCAATCATTTTCAATATTCAGTATTCAGGCTTGAAGAAATCATTTCGATATTAGACAAC  
 GTCAAGATCGTGTGTTTGCAGGATTCCTCCTTCACAACATTTGGGACATCCGCAACTGTTGA  
 GATATTGCTCTGTGTCCCTACCACCAGCGGTGAGCAAACTGTGAAAACAAAGCCGGAACA  
 TTTGCCGTACTCGGAGGAGAAACAGAGATGGCGTTTCATTTTGACAGACTCTACAGGTTTG  
 ACATCAGTGAAACACTGAGGGACCTCGGCATACAGCTGGACAGCCATGACTTTGACCTCAG  
 CATCAAGATTCAAGGAGTAAATGGATCCTACCTTGATCCACACATCCTGCCAGAGCCATCC  
 TTGATTTTTGTGCCTGGTTCAAGT

Intron d/e

AAGAAAGTTTCACTGTCTAAATCTTTTTTTATGATAGAGGGTAGAGAAGTGGAGACAATGT  
 GACAATATATTGAATAAAGTTGTTTAAATTTATAACTCTCATAAGTTCATATTATGCTGA  
 AGCTGTAGCCATCTATAACTGTGTAACATGAATGTTAAGACATTAACCTAATACTTCAG  
 CTGATAACAAACAAATGTTAATACATACGTCAATGTAACATTTTCTTATCTTTAGGTTATA  
 GCATAAAACACTTCAGAGATACAGTGACGAAAACCTCTATTTAAATATTTTCAAGT

Domäne e

TCTTTCTGCGTCTGATGGGCATTCAGATGACATCCTTGTGAGAAAAGAAGTGAACAGCC  
 TGACAACCAGGGAGACTGCATCTCTGATCCATGCTCTGAAAAGTATGCAGGAAGACCATTC  
 ACCTGACGGGTTCCAAGCCATTGCCCTTTCCATGCTCTGCCACCACTCTGCCCTTCACCA  
 TCTGCAGCTCACCGTTATGCTTGCTGTGTCCACGGCATGGCTACATTTCCCCAGTGGCACA  
 GATTGTACACTGTACAGTTCAGGATGCACTGAGGAGACATGGAGCTACGGTAGGTGTACC  
 GTATTGGGATTGGCTGCGACCGCAGTCTCACCTACCAGAGCTTGTCAACCATGGAGACATAC



CATGATATTTGGAGTAACAGAGATTTCCCCAATCCTTTCTACCAAGCCAAATATTGAGTTTG  
AAGGAGAAAACATTACAACAGAGAGAGAGAGTCAATTGCAGACAAACTTTTGTCAAAGGTGG  
ACACGTTTTTTGATAAACTGGTTCTTCAAACAAGCCATCCTAGCGCTGAGCAGGAAAACCTAC  
TGTGACTTTGAGATTCAGTTTGAATTTCTTCAACAACGGCGTTACACACGTGGGTTCGGAGGCA  
GTGCTACCTACTCTATCGGACATCTTCATTACGCATTCTACGACCCTCTTTTCTACCTTCA  
CCATTTCCAGACAGACCGTATTTGGGCAATCTGGCAAGAACTCCAGGAACAGAGAGGGGCTC  
TCGGGTGATGAGGCTCACTGTGCTCTCGAGCAATGAGAGAACCATTGAAGCCTTTTCAGCT  
TCGGCGCTCCTTATAACTGGAATCAGCTCACACAGGATTTCTCCCGACCCGAGGACACCTT  
CGACTACAGGAAGTTTGGTTATGAATATGACPAATTTAGPAATTCCTGGGAAATGTCAGTTGCT  
GAATGGATCAATACATTATTGAACATCAAGAAAATGATAGAGTATTCGCTGGGTTCCCTGT  
TGAGTGGATTTCGGAGGTTCGCGCATCAGTTAATTTCCAGGTTTGTAGAGCTGATTCCACATG  
TCAGGATGCTGGGTACTTCACCGTTCTTGGTGGCAGTGCTGAGATGGCGTGGGCATTTGAC  
AGGCTTTACAAATATGACATTACTGAATCTCTGGAGAAATGCACCTTCGATATGATGATG  
ACTTACAAATCTCTGTGAGTCTGACCGCAACAACGGAATGTCTGAGCAGCAGTCTAAT  
CCCAACACCGAGTGTCTATATTCCAGCGGGGACATC

Intron e/f

AAGTAGTAAACTGCTCAGATTGTTTTTCATAATTACTCCACTATTAAGTAAALAGTACTAGT  
AATTCATAGTACTGTTTACAGAGAAATGTAACACAATAGACCACAGAGTCCATTTGTTAA  
ACGCCTTTGGCTTGGTAAGTCTGAGGTTTTTGGTGAATGATGGAAGCTAAATATATTTTG  
ACAG

Domäne f(1)

GTGACATAAATACCAGGAGCATGTCACCGAACCCTGTTCCCGTGAGCTGAGCGATCTGTC  
TGCGAGGGACCTGTCTAGTCTCAAGTCTGCTCTGCGAGACCTACAGGAGGATGATGGCCCC  
AACGGATACCAGGCTCTTGCAGCCTTCCATGGGCTACCAGCAGGCTGCCATGATAGCCGGG  
GAAATGAGAT

Intron f

ATATTTAAAGTATTTTATCTTACGCATGACCCTGACCCTATTATTTTTTTAATCCTATGAT  
GAAACATTTACTTAGACTGGCTTGTGAGCCCCAGGCAAAATGCACTGTAAAAATACACTGA  
CAGAGGATTAGGCATTCTTGGGAGTACTGTATAGTTAGTTGCATACATATTAGCGTTCCCT  
CACTAAAACGAATCTCTGAATGCTATCAATTAAGATCATGATGCTTTGATTGTGTCTACT  
GTATTTAAATGGTGTAAAGATTTGCAATTACAATATACACAAACACGTTTCCCTGCATCTC  
GGAGAATGCAATCTTTCGTTGTACGCGTCTGTTTTCATATTTTATGCATGTAGTTTGCAC  
TACTTAGCGTCCAATAAATCCATTCAAAAATCACACAAACAAACGATTTTAGGAATGTGA  
CTGTAGCTGCAACGAATATACCTGATCCTTTCTTGTTCAGAT

Domäne f(2)

CGCATGTTGCATTCAACGGGATGCCGACCTTCCCCAGTGGCACAGACTGTACACCCTGCAG  
TTGGAGATGGCTCTGAGGAGACATGGATCATCTGTGCGCATCCCCTACTGGGACTGGACAA  
AGCCTATCTCCGAATCCCCTCGCTCTTCAACAGCCCTGAGTATTATGACCCATGGCATGA  
TGCTGTGGTAPACAACCCATTCTCCAAAGGTTTTGTCAAATTTGCAAATACCTACACAGTA  
AGAGACCCACAGGAGATGCTGTTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGTCAATCCTCTATGAGC  
AACTCTTCTTGTCTTGTGAGCAACCGACTACTGTGATTTTGTAGGTACAGTTTGTAGGTCT  
CCATAACGTGATCCACTACCTTGTGGTGGACGTCAGACCTACGCATTGTCTTCTCTGCAT  
TATGCCCTCCTACGACCCATTCTTCTTTATACACCATTCCTTTGTGGATAAGATGTGGGTAG  
TATGGCAAGCTCTTCAAAGAGGAGGAACTTCCATACAAGCGAGCTGACTGTCTGTCAA  
CCTAATGACTAAACCAATGAGGCCATTTGACTCCGATATGAATCAGAACCATTACAAAG  
ATGCACGCAGTTCCCAACACACTCTATGACTACGAGACACTGTACTACAGCTACGATAATC  
TCGAAATAGGTGGCAGGAATCTCGACCAGCTTCAGGCTGAAATTGACAGAAGCAGAAGCCA





18/29

CGATCGCGTTTTTGGCTGGATTCTTGCTTCGTGGAATCGGAACTTCTGCTGATGTCAGGTTT  
TGGATTTGTAGAAATGAAATGACTGCCACAGGGGTGGAATAATTTTCATCTTAGGTGGAG  
CCAAGGAAATGCCATGGTCATTTGACAGAACTTCAAGTTTGATATCACCCATGTACTCGA  
GAATGCTGGCATTAGCCCAGAGGACGTGTTTGATGCTGAGGAGCCATTTTATATCAAGGTT  
GAGATCCATGCTCTTACAAAGACCATGATACCGTCGTCTGTGATCCCAGCCCCAACTATCA  
TCTATTCTCCTGGGGAAG

Intron f/g

GTGAGAGAACCAGTAATAGCTACTGTCTACAAAGAATGTGTTCAATTTAAGACCTGACTGT  
AGGCCGATGGCTGCTGTCATCTCCTCCGCCCTCCTCCTGTTCCCTCCGAAGGGGTCA  
GCTTCAGGTTCTCTTGCCAATATGCCAAGCAGACCTCCTGAGCAGGCAGTATATATACGTA  
AGGGAAGCAAGTATGGACCATCGCGCGGCATGTAGAGATACAATGATCAGCTGTCTGCTGT  
TCCACTCCTGTGACACAATGAGATAAACATGAATACAGTATTACTCAGCAGCGTTCCAATT  
TTCAACCCTCGTATTTTATTAAGGAATTTTAAATATATTTTCTCCTTGTTGAAATA  
TTTTAGTAAGTGTAAATCGATATAGAGTGGAGTAGTGACGCTTTATTTCCGGTTCATTCTCG  
AAACAAAATATATAATAGTCCACTGAACTCTCTTAAATTGTTTTTACAACCTTCAACTGCCA  
CAGACGTAATCCCTCACGTTATTTTGAGCTGACAACGTGTTGAATTGAGTGTGTTCCGAAT  
TCTAATAAAGCATGTATATATTTACGTCTCATGCAAGTAATATATGTTTAACTGATGACGT  
CACTTGGTGACCACTGATTTAGTTCCTTTGTCATAATTGCAGTTTCTGTTGTCACGGGGAC  
GGTGGGGAAGCCAGGTTCCCTCCTGTACGCTGAATATCCCGTTTGAATCCCCACATGGGT  
ACAAAGTGTGATGCCTATTTCTGGTGTCCCCACCGTGATATTGCTGGAATAAGTGGCTTA  
ATACCATATACACTCACTCTATTGTCACTACTGCCACCGGCTCACACCTCTGATGCTTC  
TGTTCTATCCAG

Domäne g(1)

GTCGCGCTGCTGACAGTGCGCACTCTGCCAACATTGCTGGCTCTGGGGTGAGGAAGGACGT  
CACGACCCTCACTGTGTCTGAGACCGAGAACCTAAGACAGGCTCTTCAAGGTGTCATCGAT  
GATACTGGTCCCAATGGTTACCAAGCAATAGCATCCTTCCACGGAAGTCCCTCCAATGTGCG  
AGATGAACGCGCGCAAGGTTGCCTGTTGTGCTCAG

Intron g(1)

GTAATTAATGGATGTGAAGTCAATGTCCGAGGGTATAATAAGGATTTAAATACTTCAGTCG  
TGTAATACTGTATGACATGTGTATTGGATGGTGTAGGTATTACAGGTTATAAGGCCAGTGT  
GTGTTGGGACGGTTACTTTCCCTGCACTAGTAATAAGCATTGTATTTAGCTAGCTTTTATCA  
TATACTTTAGTTTCAGGTTTGTGGCAATTGAAATCGAAATTTCTTTCAATTTCAAGGTTA  
TCGCACTCGTGTGNAGAATAGTTACTATGCTGCATTGAGAATAACACTATAGTAATAAG  
CATATCATACAGTAAGAATAACACTATAGTAATAAGTATATCATNCAGTAAGAATGTGAT  
TGTATGATAAATAGGTTATCACACTCGTGTGTTTTAGAAATGGTTACTATCCCAGGAATAAC  
CACTATGTATTACATGTATATTGGGCAGTGTAAAGTAGTAGCATTGTATATTAAATCAGTAT  
ATCGTGCTTCAAACACCAGGATATATGGGGTATACAGTGGGCAGTGTAAAGTAGCAACATT  
GTATATTAAATCAGTATATCGTACTTCAAACACCAGGATTATGGGGTATACAGTGGGCAG  
TGTAAGTAGTAGCATTGTATATTAAATCAGTATATCGTACTTCAAACACCAGGATATAAT  
TCAGTATATCGTGCTTCAAACACCAGGATATAATTCAGTATATCGTGCTTCAAACACCA  
GGATATATGGGATATACAGTGCGGGTTTGCAATACACCTCCACCCCTTTACAG

Domäne g(2)

GTATGGCCTCCTTCCACACTGGCACAGACTGTATGTGAAGCAGATGGAAGATGCCCTGGC  
TGACCACGGGTACATATCGGCATCCCTTACTGGGACTGGACAACCTGCCTTCACAGAGTTA  
CCCGCCCTTGTACAGACTCCGAGAACAATCCCTTCCATGAG



19/29

## Intron g(2)

GTCAGTTT AGTCTCCTGTCTGAGCTAACGATACCAATTTCTATTTTTCGAGAACCACGATG  
ACGAGAAAACAAGCAATATAGATATAGATGCAGTATAGATCAAGTTAATGAATTCATTGCT  
ATATGTTTGCTTGTAATAAAGCTTTAAGAAAACGAGAGCATGCACACAATGAAACAAACAA  
TTATGTGTTTGATAGGAATATGATATATGTATTTGGGGGCTGACGTGAGCAGGGCTTGAAGG  
GACAGTTTACATTGTCTAGTAACACTGGGAGTATTCTTTGATCCACAATATATAGTTTCAAT  
GTGTTTCAGCAGTTACAACTAACATTATATCATACATTACGTCGTAACATGCTTCTTTTGTC  
CTCTTTTGCCAG

## Domäne g(3)

GGTCGCATTGATCATCTCGGTGTAACCACGTCACGTTCCCCCAGAGACATGCTGTTTAAAG  
ACCCAGAGCAAGGATCAGAGTCGTTCTTCTATAGACAAGTCCTCCTGGCTTTGGAGCAGAC  
TGACTACTGCCAGTTTGAAGTCCAGTTTGAGCTGACCCACAACGCCATTCACTCCTGGACA  
GGTGGACGTAGCCCTTACGGAATGTGACCCCTCGAGTTTACAGCCTACGATCCTCTCTTCT  
GGCTTCACCACTCCAACACCCGACAGAACTCTGGGCTGTCTGGCAAGCACTGCAGAAATACCG  
AGGACTCCCATAACAACGAAGCACACTGTGAAATCCAGGTTCTGAAACAGCCCTTGAGGCCA  
TTCAACGATGACATCAACCACAATCCAATCACCAGACTAATGCCAGGCCCTATCGATTCA  
TTGATTATGAGAGGTTTAACTATCAGTATGACACCCTTAGCTTCCATGGTAAGAGCATCCC  
TGAAGTGAATGACCTGCTCGAGGTAAGAAAAGAGAGAGAGAACATTTGCTGCTTCTCTT  
CTTCGTGGAATCGGTTGCACTGCTGATGTCTCTTTGACATCTGCCGCCCCAATGGTGACT  
GTGTCTTTGCAGGAACCTTTGCTGTGCTGGGAGGGGAGCTAGAAATGCCTTGGTCCTTCGA  
CAGACTGTTCCGCTATGACATCACCAGAGTCATGAATCAGCTCCATCTCCAGTATGATTCA  
GATTTTCAGTTTCAGGGTGAAGCTTGTGCCAACCAATGGCACTGAGCTTTCATCAGACCTTC  
TCLAGTCACCAACAATTTGAACATGAACCTTG

## Intron g/h

GTATGTTATCTTATCATCAATGTGTGATCAGATACTGGAGACGTTTTTCATATTAACCTTGG  
TCAGCATTAGTTGATGATTTTGGTGCGATGTTGACGACAAGGAGTCAAGCATTAAACACATT  
CAACACATCTTTAATCTGATATGAGAAGGGGAATAAATTGATCCAGTATTGATGATTGAAGT  
TAGATTAACAGTGAAAGATATACCAGTTTGTATAATCGTATAAAACAGTAGCAGAAATTGTA  
TCGTGAAAACATAAATGTGGGAAGGCGAACGCCAAGCAGATTTTAGATTACGATCGTGTGCT  
AGAATAATTCACAATAACCCAGACGTCGGAATGTGGTTGTCTATGGCAATGGTTACGATT  
AATTGCTAACATGCACGATTTACCTATTTCTG

## Domäne h

AGCCACACAGAGGACCAGTTGAAGAAACAGAAAGTCACTCGCCACATACTGACGGCAATGCA  
CACTTTTCATCGTAAGGAAGTTGATTCGCTGTCCCTGGATGAAGCAACAACTTGAAGAATG  
CCCTTTTACAAGCTACAGAACGACCACAGTCTAACGGGATACGAAGCAATCTCTGGTTACCA  
TGGATACCCCAATCTGTCTCCGGAAGAGGCGATGACAAAATACCCCTGCTGCGTCCCCGG  
ATGGGCATCTTTCTTACTGGCACAGACTCTTGACCAATCAACTGGAAAGAGCTCTTGAGC  
ACAATGGTGCACCTGCTTGGTGTCTTACTGGGACTGGAACAAGGACCTGTCTGCTCACTGCC  
GGCGTTCTTCTCCGACTCCAGCAACAACATCCCTACTTCAAGTACCACATCGCCGGTGT  
GGTCACGACACCGTCAGAGAGCCAACTAGTCTTATATATAACCAGCCCCAAATCCATGGTT  
ATGATTATCTCTATTACCTAGCATTGACCACGCTTGAAGAAAACAATTACTGGGACTTTGA  
GGTTCAGTATGAGATCCTCCACAACGCGTCCACTCCTGGCTTGGAGGATCCCAGAAGTAT  
TCCATGTCTACCTGGAGTATTCGGCCTTTGACCTGTCTTTATGATCCTTCACTCGGGTC  
TAGACAGACTTTGGATCATCTGGCAAGAAGTTCAGAAGATCAGGAGAAAGCCCTACAACCT  
CGCTAAATGTGCTTATCATATGATGGAAGAGCCACTGGCGCCCTTCAGCTATCCATCTATC  
AACCAGGACGAGTTCAACCGTGCCAACTCCAGCCTTCTACAGTTTTTTCAGAGCCATAAGT



20/29

TCGGCTACCATTACGATAACCTGAATGTTAGAGGTCACAGCATCCAAGAACTCAACACAAT  
CATCAATGACTTGAGAAACACAGACAGAATCTACGCAGGATTTGTTTTGTCAGGCATCGGT  
ACGTCTGCTAGTGTCAAGATCTATCTCCGAACAGATGACAATGACGAAGAAGTTGGAACCT  
TCACTGTCTCTGGGAGGAGAGAGGGAAATGCCATGGGCCTACGAGCGAGTTTTCAAGTATGA  
CATCACAGAGGTTGCAGATAGACTTAAAATTAAGTTATGGGGACACCCTTTAACTTCGGGA  
ACTGGAGATCACATCCTTACGAATGGAATCGGTGGTAAACAAGAGCCTACCCAAATCCTTT  
CATCATCTACAGACCTGCCAATCATGACTACGATGTTCTTGTTATCCCAGTANGGAAGAAA  
CCTTCACATCCCTCCCAAAGTTGTCGTCAAGAAAGGCACCCGCATCGAGTTCACCCAGTC  
GATGATTCAAGTTACGAGACCAGTTGTTGATCTTGGAAGCTACACTGCACTCTTCAACTGTG  
TGGTACCACCGTTTACATACCACGGATTGGAAGTGAACCACGTCTATTCTGTCAAGCCTGG  
TGACTACTATGTTACTGGACCCACGAGAGACCTTTGCCAGAATGCAGATGTCAGGATTCAT  
ATCCATGTTGAGGATGAGTAA

3' UTR

CGCAACAGGT

Intron UTR

GAGATAAGAAACCCTTCTAACAGTAATACGACACCACATTACAGCTTAAACATGATTGCCA  
TCGATGTTTTTCATGTGTAGTATACGCTTTTCAGTTCTACATAATTTTGTTTTTCAAATCAA  
GTTTAGCAAATGAATCTATCACTGGAAAATAGGGTAGGGTAGCCAAGTGGTTAAAGCGGTC  
ACTGATCACGCCAAAGACGAGTGTCTAACCTGCATGGGTACAAAAGTGAAGACCATTGCT  
GGTGTCTACCGCCGTAATATTGTTTTTAGTATTGCTAAAACCTTATACTCACCCATGCGCTG  
TAAAAGTGGAAATAATAATCATATTTCAACAAAAGCACAAAACCATTTTCAATTTTCATGAAAG  
CCTCTTGTTTACCTGAAAGACGCAAGAGAACAATAGTTCCTAACATTATTTTCAGACATTG  
GAAATGTCCTGCACGTGTAAACCATATATCCTTTGAAATTTTTTACGACTGCATCGTATACA  
ATTTATGATATAAATTTAAAACCTTTAT

3' UTR

TTCTTGGTCTCCACATATTCACATATCAGCACCAATGGTTTTCGAAGGACATTGGCGTTCT  
TCTCTGGCAATGCATTTCAATACAACATTGAAAATGACTTCAGCATATCAGTGTGCTTCGA  
ACGTGTTCCGGAAGTACTCAAATGTGCTATGACTGAATTATTGTACATACATACTTATTG  
ATGTTCAATAAATAAATGTTGAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA



21/29

Figur 7

Abgeleitete Primärstruktur des HtH2

## Domäne b

HRLFVTQVEDALIRRGSPIGVPYWDWTQPMALPGLADNATYRDPI SGDSRHNPFDHVEVA  
FENGRTERRHPDSRLFEQPLFGKHTRLFDSIVYAFEQEDFCDFEVQFEMTHNNIHAWIGGGE  
KYSMSSLHYTAFDPIFYLRHSNTDRLWAIWQALQIRNRNPYKAHCAWSEERQPLKPFAPSS  
PLNNEKTYENSVPNTNVYDVEGVLGYTYDDLNFGGMDLGQLEEYIQRQRQRDRTFAGFFLS  
HIGTSANVEIIIDHGTLHTSVGTFPAVLGGEKEMKWGFDRLYKYEITDELRLQLNLRADDVFS  
ISVKVTDVDGSELSSSELIPSAIIIFERSH

## Domäne c

IDHQDPHHDTIIRKNVDNLTPEEINSLRRAMADLQSDKTAGGFQQIAAFHGEPKWCPSPDA  
EKKFSCCVHGMVFPWHRLTLVQGENALRKHGCLGALPYWDWTRPLSHLPDLVLVSSRTT  
PMPYSTVEARNPWYSGHIDTVGVDTTRSVRQELYEAPGFGHYTGVAKQVLLALEQDDPCDF  
EVQFEIAHNFIALVGGSEPYGMASLRYTTYDPIFYLRHSNTDRLWAIWQALQKYRGKPYN  
SANCALASMRKPLQPFGLTDEINPDDETROHAVPFSVFDYKNNFNYYEYDTLDFNGLSISQL  
DRELSRRKSHDRVFAGFLLHGIQQSALVKFFVCKSDDDCDHYAGEFYILGDEAMPWGYDR  
LYKYEITEQLNALDLHIGDRFFIRYEAFDLHGTSLGSNIFPKPSVIHDEGA

## Domäne d

GHHQADEYDEVVTAASHIRKNLKDLSKGEVESLRS AFLQLQNDGVYENIAKFHGKPGLCDD  
NGRKVACCVHGMPTFPQWHRLYVLQVENALLERGS AVSVPYWDWTETFTELPSLIAEATYF  
NSRQQTFDPNPFFRGKISFENAVTTRDPQPELYVNRYYYQNVMLVFEQDNYCDFEIQFEMV  
HNVLHAWLGGRATYSISSLDYSAFDPVFFLHHANTDRLWAIWQELQRYRKKPYNEADCAIN  
LMRKPLHPPDNDLNDPVTFKYSKPTDGFQYQNNFGYKYNLEFNHFSIPRLEETIRIRQ  
RQDRVFAGFLLHNI GTSATVEIFVCVPTTSGBQNCENKAGTFAVLGGETEMAFHFDRLYRF  
DISETLRDLGIQLDSHDFDLSIKIQGVNGSYLDPHILPEPSLIFVPGSS

## Domäne e

SFLRPDGHSDDILVRKEVNSLTRETASLIHALKSMQEDHSPDGFQAIASFHALPPLCPSP  
SAAHRYACCVHGMATFPQWHRLYTVQFDALRRHGATVGVYWDWLRPQSHLPPELVMTET  
HDIWSNRDFFPNPFYQANIEFEGENITTE REVIADKLFVKGGHVFDKLVLTQSHPSAEQENY  
CDFEIQFEIILHNGVHTWVGGSRTYSIGHLHYAFYDPLFYLLHFFQTDRIWAIWQELQEQRL  
SGDEAHCALEQMRPLKPFSGAPYNWNQLTQDFSRPEDTFDYRKFGYEYDNLEFLGMSVA  
ELDQYIIIEHQENDRVFAGFLLSGFGGSASVNFQVCRADSTCQDAGYFTVLGGSAEMAWAFD  
RLYKYDITETLEKMHLYDDDFTTISVSLTANNGTVLSSSLIPTPSVIFQRGH

## Domäne f

RDINTRSMSPNRVRRELSDL SARDLSSLSKSA LRDLQEDDGPNGYQALAAFGHLPAGCHDSR  
GNEIACCIHGMPTFPQWHRLYTLQLEMALRRHGSSVAIPYWDWTKPISELPSLFTSPEYYD  
PWHDAVVNNPFSKGFVKFANTYTVRDPQEMLFQLCEHGESILYEQTLLALEQTDYCDFEVQ  
FEVLHNVIHYLVGGGRQTYALSSSLHYASYDFFFFIHHSFVDKMWVWQALQKRRKLPHYKRA  
CAVNLMTKPMRPFDSMDNQNPF TKMHA VPNTLYDYETLYYSYDNLEIGGRNL DQLOAEIDR





22/29

SRSHDRVFAGFLLRGIGTSADVRFWICRNENDCHRGIIIFILGGAKEMPWSFDNFKFDIT  
HVLENAGISPEDVFDAAEPFYIKVEIHAVNKTMI PSSVI PAPTIIYSPGE

Domäne g

GRAADSAHSANIAGSGVRKDVTTTLTVSETENLRQALQGVIDDTGPNQYQAIASFHGSPPMC  
EMNGRKVACCAHGMASFPHWHRLYVKQMEDALADHGSHIGIPYWDWTTAFTLPAVLTDS  
NNPFHEGRIDHLGVTTSRSPRDMLENDPEQGSSEFFYRQVLLALEQTDYCQFEVQFELTHN  
AIHSWTGGRSPYGMSTLEFTAYDPLFWLHHSNTDRIWAVWQALQKYRGLPYNEAHCEIQVL  
KQPLRPFNDINHNPIITKTNARPIDSFDYERFNYQYDTLSFHGKSIPELNDLLEERKREER  
TFAAFLLRGIGCSADVVDICRPNNGDCVFAGTFAVLGGELEMPWSFDRLFRYDITRVMNQL  
HLQYDSDFSFRVKLVATNGTELSSDLLKSPTIEHEL

Domäne h

GAHRGPVEETEVTROHTDGNNAHFHRKEVDSLSDLDEANNLKNALYKLQNDHSLTGYZAISGY  
HGYPNLCPEEGDDKIPLLRPRMGIFPYWHRLTIQLERALEHNGALLGVYPYWDWNKDLSSL  
PAFFSDSSNNNPYFKYHIAGVGHD TVREPTSLIYNQPIHGYDYLYYLALETTEENNYWDF  
EVQYEILHNAVHSLWLGGSQKYSMSTLEYSAFDPVFMILHSGLDRLWI IWQELQKIRRKPIN  
FAKAYHMMEEPLAPFSYPSINQDEFTRANSKPSTVFD SHKFGYHYDNLNVRGHSIQELNT  
IINDLRNTDRIYAGFVLSGIGTSASVKIYLRTDDNDEEVGTFTVLGGEREMPWAYERVFKY  
DITEVADRLKIKLWGHPLTSGTGDHILTNGIGGKQEP TQILSSSTDLPIMTTMFLLSQXGR  
NLHI PPKV VVKGTRIEFHPVDDSVTRPVVDLGSYTALENCVVPPTTYHGFELNNAVYSVKP  
GDYYVTGPTRDLCQNAADVRIHIHVEDE



Figur 8

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des KLH1

## Domäne b

GGCCTACCGTACTGGGACTGGGACTGAACCCATGACACACATTCCGGGTCTGGCAGGAAACA  
AAACTTATGTGGATTCTCATGGTGCATCCCACACAAATCCTTTTCATAGTTCAGTGATTGC  
ATTTGAAGAAAATGCTCCCCACACCAAAAGACAAATAGATCAAAGACTCTTTAAACCCGCT  
ACCTTTGGACACCACACAGACCTGTTCAACCAGATTTTGTATGCCTTTGAACAAGAAGATT  
ACTGTGACTTTGAAGTCCAATTTGAGATTACCCATAACACAGATTACAGCTTGGACAGGAGG  
AAGCGAACATTTCTCAATGTTCCTCCCTACATTACACAGCTTTTCGATCCTTTGTTTTACTTT  
CACCATTCTAACGTTGATCGTCTTTGGGCGCTTTGGCAAGCCTTACAGATGAGACGGCATA  
AACCTTACAGSGGCCACTGCGCCATATCTCTGGAACATATGCATCTGAAACCATTCGCCTT  
TTCATCTCCCCCTTAACAATAACGAAAAGACTCATGCCAATGCCATGCCAAACAAGATCTAC  
GACTATGAAAATGCTCTCCATTACACATACGAAAGATTTAACATTTGGAGGCATCTCTCTGG  
AAAACATAGAAAAGATGATCCACGAAAACGAAAGACAGAATATATATGCGCGTTTCT  
CCTGGCTGGCATAAGTACTTCAGCAATGTTGATATCTTCATTAAACTACCGATTCCGTG  
CAACATAAGGCTGGAACATTTGCAGTGCTCGGTGGAAGCAAGGAAATGAAGTGGGGATTTG  
ATCGCGTTTTCAAGTTTGACATCACGCACGTTTTGAAAGATCTCGATCTCACTGCTGATGG  
CGATTTGAAAGTTACTGTTGACATCACTGAAGTCGATGGAACATAACTTGCATCCAGTCTT  
ATTCACATGCTTCTGTCTTCGTGAGCATGCACGTGGTAAGCTGAATAGAG

## Intron b/c

GTTTTGTAATAATTATGTAGAATTCCTTACCTCAGAATAAGATGAGGTCACATGGGTTTTG  
CAAACTATTACGTTTGAATTAATATTAATAATACCGGACCCTCCACTGGTACATATTTAT  
CTTTATAACGATAATAGCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
ATGATGCCGGTATTGCACGTAATCCAGCCGACTTAGATGACACCCTAAGGGTGCAGAAAGT  
ATAACAATTAGATTGCGTTTGCATCTGTGTATGCGTGTGCTTTAAACCAAAAGTCAAAATAA  
AAGTGCAAAACCCTTAGTTTATTCATTTGATAGAGCCTTTTACGATAAGAACAATGTAATAA  
ATTAGAACATAACTGAAACCTCCGAAAGAGAGGCTGTTTGTCAAGAGAGGTATCGACATGA  
TTGACTTATAAACCTGTGCTTCTATATTTTGGAACTGTCCACTTTCTTGTGTGTGTACTG  
TAATCACATCGCACTATGGCTGCAAGACGTGTACGAGTACACTATATACTTACCTAATGAC  
CAACCACAAGGCTGGCTTTGTTAATATTGTTATTTTACAGAAATAACACAGAATTCCAGC  
ATTTGGCTGGTGTATTTAGCAAAACACCGATATGACACTCATGTTTTATTACATTTTTTTC  
AG

## Domäne c

TTAAATTTGACAAAGTGCCAAGGAGTCGTCTTATTCGAAAAAATGTAGACCGTTTGAGCCC  
CGAGGAGATGAATGAACTTCGTAAAGCCCTAGCCTTACTGAAAGAGGACAAAAGTGCCGGT  
GGATTTTACAGCAGCTTGGTGCATTCATGGGGAGCCAAAATGGTGTCTTAGTCCCGAAGCAT  
CTAAAAAATTTGCCCTGCTGTGTTTACGGCATGCTGTGTTCCCTCACTGGCATCGACTGTT  
GACGGTTCAGAGTGAAAATGCTTTGAGACGACATGGCTACGATGGAGCTTTGCCGTACTGG  
GATTTGGACCTCTCCCTCTTAATCACCTTCCCGAACTGGCAGATCATGAGAAGTACGTGACCC  
CTGAAGATGGGGTAGAGAAGCATAACCCTTGGTTTCGATGGTTCATATAGATACAGTCGACAA  
AACAAACAACAAGAAGTGTTCAGAATAAATCTTCGAACAGCCCTGAGTTTGGTCATTATACA  
AGCATTGCCAACAAGTACTGCTAGCGTTGGAACAGGACAATTTCTGTGACTTTGAAATCC  
AATATGAGATTGCCCATAACTACATCCATGCACCTTGTAGGAGGCGCTCAGCCTTATGCTAT  
GGCATCGCTTCGCTACACTGCTTTTGTATCCACTATTCTACTTGCATCACTCTAATACAGAT  
CGTATATGGGCAATATGGCAGGCTTTACAGAAGTACAGAGGAAAACCGTACAACGTTGCTA  
ACTGTGCTGTTACATCGATGAGAGAACCTTTGCAACCATTTGGCCTCTCTGCCAATATCAA  
CACAGACCATGTAACCAAGGAGCATTCAGTGCCATTCAACGTTTTTGTATTACAAGACCAAT



24/29

TTCAATTATGAATATGACACTTTGGAATTTAACGGTCTCTCAATCTCTCAGTTGAATAAAA  
AGCTCGAAGCGATAAAGAGCCAGACAGGTTCTTTGCAGGCTTCCTGTTATCTGGTTTCAA  
GAAATCATCTCTTGTAAATTCAATATTTGCACCGATAGCAGCAACTGTCACCCCGCTGGA  
GAGTTTTACCTTCTGGGTGATGAAAACGAGATGCCATGGGCATACGATAGAGTCTTCAAAT  
ATGACATAACCGAAAACCTCCACGATCTAAAGCTGCATGCAGAAGACCACTTCTACATTGA  
CTATGAAGTATTTGACCTTAAACCAGCAAGCCTGGGAAAAGATTTGTTCAAGCAGCCTTCA  
GTCATTTCATGAACCAAGAATAG

Intron c/d

GTAAGTTGTTATATGTTTCGAATATTGCCGATACCTTCAATATATATACTTTATCAAAGTAA  
TTGATTAAATCTGAAGTAATTTTCCCTTTCCAGTAGAGATTCAGTTGATACAACAAGAATTG  
CCCTGTTGTATGTCACTTTATTTTCATCAAACGATTGGAAGTGAGCTGTCCATGCCACAAT  
GGGGTCTCTGTAAGTTTCTCGTATGGGGTATAGATTATATAGACGTGGCAGACCTTACGTA  
TAACTAATATTTGTGTAATGTCGTTTCAG

Domäne d

GTCACCATGAAGGCGAAGTATATCAAGCTGAAGTAACTTCTGCCAACCGTATTGAAAAAA  
CATTGAAAATCTGAGCCTTGGTGAACCTCGAAAGTCTGAGAGCTGCCTTCCCTGGAAATTGAA  
AACGATGGAACTTACGAATCAATAGCTAAATTCCATGGTAGCCCTGGTTTGTGCCAGTTAA  
ATGGTAACCCCATCTCTTGTGTGTCCATGGCATGCCAACTTTCCCTCACTGGCACAGACT  
GTACGTGGTTGTGCTTGAGAATGCCCTCCTGAAAAAAGGATCATCTGTAGCTGTTCCCTAT  
TGGGACTGGACAAAACGAATCGAACATTTACCTCACCTGATTTTCAGACGCCACTTACTACA  
ATTCCAGGCAACATCACTATGAGACAAACCCATTCCATCATGGCAAAATCACACACGAGAA  
TGAAATCACTACTAGGGATCCCAAGGACAGCCTCTTCCATTGAGACTACTTTTACGAGCAG  
GTCCTTTACGCCTTGGAGCAGGATAACTTCTGTGATTTTCGAGATTCAGTTGGAGATATTAC  
ACAATGCATTGCATTCTTTACTTGGTGGCAAAGGTAAATATTCCATGTCAAACCTTGATTA  
CGCTGCTTTTGATCCTGTGTTCTTCCCTTCATCACGCAACGACTGACAGAATCTGGGCAATC  
TGGCAAGACCTTCAGAGGTTCCGAAAACGGCCATACCGAGAAGCGAATTGCGCTATCCAT  
TGATGCACACGCCACTCCAGCCGTTTGATAAGAGCGACAACAATGACGAGGCAACGAAAC  
GCATGCCACTCCACATGATGGTTTTGAATATCAAAACAGCTTTGGTTATGCTTACGATAAT  
CTGGAAGTGAATCACTACTCGATTCCCTCAGCTTGATCACATGCTGCAAGAAAGAAAAAGGC  
ATGACAGAGTATTCGCTGGCTTCCTCCTCACAATATTGGAACATCTGCCGATGGCCATGT  
ATTTGTATGTCTCCCAACTGGGGAACACACGAAGGACTGCAGTCATGAGGCTGGTATGTTT  
TCCATCTTAGGCGGTCAAACGGAATGTCCTTTGTATTTGACAGACTTTACAACTTGACA  
TAACTAAAGCCTTGAAAAAGAACGGTGTGCACCTGCAAGGGGATTTGATCTGGAAATTGA  
GATTACGGCTGTGAATGGATCTCATCTAGACAGTCATGTCTCATCCACTCTCCCACTATACTG  
TTTGAGGCCCGAACAG

Intron d/e

GTAAGTATTTTGTCACTGTAAACCAACAACCTGCAGTCTATTTTGCAATTACGATAATAACAA  
TTTTTGAAATATATCTTTATTAAGCAAAGGTTTCTAGAGACAAACAGCCGGCTCTAATTA  
TTTTTTTGAAGCTTACGCTTGAGTAAAGATCTGCAATGGCAACCCTACCTATACTATTA  
AATATAATGTTACATTGCTATCTGAATGTTTAAATAATCACTTCATATTCTGTTGCAG

Domäne e

ATTCTGCCCCACACAGATGATGGACACACTGAACCAGTGATGATTGCAAGATATCACACA  
ATTGGACAAGCGTCAACAACCTGTCAGTGGTGAAGCCCTCGAGTCCATGAAAGCCGACCAT  
TCATCTGATGGGTTCCAGGCAATCGCTTCCTTCCATGCTCTTCCCTCCTTTGTCCATCAC  
CAGCTGCTTCAAGAGGTTTGCGTGCTGCGTCCATGGCATGCCAACCTTCCCGCAATG



25/29

Figur 9

Abgeleitete Primärstruktur des KLH1

## Domäne b

GLPYWDWTEPMTHIPGLAGNKTYVDSHGASHTNPFHSSVIAFEENAPHTKROIDQRLFKPA  
TFGHHTDLENQILYAFEQEDYCDFEVQFEITHNTIHAWTGGSEHFSMSSLHYTAFDPLFYF  
HHSNVDRLWAVWQALQMRRHKPYRAHCAISLEHMLKPFAPSSPLNNNEKTHANAMPNKIY  
DYENVLHYTYEDLTFFGGISLENIEKMIHENQOEDRIYAGFLLAGIRTSANVDIFIKTDSV  
QHKAGTFAVLGGSKEMKWGFDRVFKFDITHVLKDLDLTADGDFEVTVDITEVDGTKLASSL  
IPHASVIREHARGKLNK

## Domäne c

VKFDKVPRSRLIRKNVDRLSPEEMNELRKALALLKEDKSAGGFQQLGAFHGEPKWCPSP  
SKKFACCVHGMSPVFPWHRLTVQSENALRRHGYDGALPYWDWTSPLNHLPELADHEKYVD  
PEDGVEKHNPWFDDGHIDTVDKTTTTSVQNKLEFQPEFGHYTSIAKQVLLALEQDNFCDFEI  
QYEIAHNYITHALVGGGAQPYGMASLRYTAFDPLFYLLHHSNTDRIWAIWQALQKYRGKPYNVA  
NCAVTSMPREPLQPFGLSANINTDHVTKEHSVPFNVDYKTNFNVEYDTLEFNGLSISQLNK  
KLEAIKSQDRFFAGFLLSGFKKSSLVKFNICTDSSNCHPAGEFYLLGDENEMPWAYDRVEK  
YDITEKLHDLKLHAEDHFIYIDYEVFDLKPASLGKDLFKQPSVIEPRI

## Domäne d

GHHEGEVYQAEVTSANRIRKNIENLSLGELESRAAFLEIENDGTYESIAKFHGS PGLCQL  
NGNPISCCVHGMPTFPWHRLYVVVENALLKKGSSVAVPYWDWTKRIEHLPHLISDATYY  
NSRQHHYETNPFHHGKIITHENEITTRDPKDSLHSDYFYEQVLYALEQDNFCDFEIOLEIL  
HNALHSLGKGKYSMSNLDYAAFDPVFFLHHATTDRIWAIWQDLQFRKRPHYREANCAIQ  
LMHTPLQPFDKSDNNDEATKTHATPHDGFYQNSFGYAYDNLELNHYSIPOLDHMLQERKR  
HDRVFAAGFLLHNIGTSADGHVFCVCLPTGEHTKDCSHEAGMFSILGGQTEMSFVFDRLYKLD  
ITKALKKNGVHLQGDFFLEIEITAVNGSHLDSSHVHSPTILFEAG

## Domäne e

DSAHTDDGHTEPVMIRKDITQLDKRQQLSLVKALESMKADHSSDGFQAIASFHALPPLCPS  
PAASKRFACCVHGMPTFPQWHRLYTVQFQDSLRLKHGAVVGLPYWDWTLPR





26/29

Figur 10

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des KLH2

## Domäne b

GGCCTGCCCTACTGGGATTGGACCATGCCAATGAGTCATTTGCCAGAACTGGCTACAAGTG  
 AGACCTACCTCGATCCAGTTACTGGGGAAACTATAAACAACCCTTTCCATCACGCCCAAGT  
 GGCGTTTGAAAATGGTGTAAACAAGCAGGAATCCTGATGCCAACTTTTATGAAACCAACT  
 TACGGAGACCACACTTACCTCTTCGACAGCATGATCTACGCATTTGAGCAGGAAGACTTCT  
 GCGACTTTGAAGTCCAATATGAGCTCACGCATAATGCAATACATGCATGGGTTGGAGGCAG  
 TGAAAAGTATTCAATGTCTTCTCTTCACTacactGCTTTTGATCCTATATTTTACCTCCAT  
 CACTCAAATGTTGATCGTCTCTGGGCCATTTGGCAAGCTCTTCAAATCAGGAGAGGGCAAGT  
 CTTACAAGGCCCACTGCGCCTCGTCTCAAGAAAGAGAACCATTAAAGCCTTTTGCATTGAC  
 TTCCCCCACTGAACAACAACGAGAAAACGTACCACAACCTCTGTCCCCACTAACGCTTTATGAC  
 TATGTGGGAGTTTTGCACCTATCGATATGATGACCTTCAGTTTGGCGGTATGACCATTGTCAG  
 AACTTGAGGAATATATTACAAAGCAGACACAACATGATAGAACCCTTGCAGGATTCTTCCT  
 TTCATATATTGGAACATCAGCAAGCGTAGATATCTTCATCAATCGAGAAGGTCATGATAAA  
 TACAAAGTGGGAAGTTTTGTAGTACTTGGTGGATCCAAAGAAATGAAATGGGGCTTTGATA  
 GAATGTACAAGTATGAGATCACTGAGGCTCTGAAGACGCTGAATGTTGCAGTGGATGATGG  
 GTTCAGCATTACTGTTGAGATCACCGATGTTGATGGATCTCCCCCATCTGCAGATCTCATT  
 CCACCTCCTGCTATAATCtTTGaACGTGGTCaTG

## Intron 2b/c

AGGTATTTAAAAAAGTAATAAAACCcTATTTTCGAATGCGCTTTATGAAATATCGTGTGAC  
 TGGTTCTTTAGTTTACATGGAGTGTAACAACATGCTCCATCAGTTGACATATACTGCTCAC  
 ACAAGTAAGGGATATTTGATAATGATAACAAATATAATCAAAGCGGTTATACTATCAAGA  
 CTTATTCACATAATTACAGGTGAAGGGAGGTGTGATCGTGTTCAGTATCAGGTTGAGGCC  
 AGAGAAGTCCCAGTTTGAGTCTTGCAAGAAGATGATGTTTAGGCATGGGGTCGAATCACCA  
 AATCACATGACTTCAATAACGGGTTGGACCACCTCGAGCGACgATGCAAGCAGTAGAGCT  
 CTACGCATGCTCCTGATAAGGCGACCAATCTGTTTCTGGGGAATCAGcCGCCACTCCTCTT  
 GTAGTGCCACGCTCATTCTGCTACGGTCTGGGTACCTGCTATCGGcTCTTGATCCGTAT  
 CCCAAGGATGTCCACACATGTTCAAcGTGAGAGGTGCGGGGAACATCGCTGGCCACGGTzA  
 GGcCTGAATTTGATGCCGTTGAAAGTGAGCTCTGACAACcTGAGCATGGcGAGCTCTGACG  
 TTGTGCTCCTGAAAGATGAATcCAGCTcCaTGaCAGCGAGCAAaGGGCAGGACGTGTTGGT  
 CAATGCAGTTGTCTCTGCAGTACACACCTGTCACTCGCCACTCACAAGCGTGTAGATCTGT  
 ACGACCAGTCATGGAGATCCAGCCACATCATAACGGACCCCTATCCATACCGATCATGA  
 GCCACCATAGCAGCGTCTTGATGACGTTCTCCCTGTGCGCTCGACATCCTcACACGGGCCAA  
 AAGGAACGTGGACTCGTCACTGAACATGACATTAGCCAACCTGGCACTTGTCCACCGCTGA  
 TGTTGGCGAGACCATTCCAGTCGAGCTCTTCGGTGTCTGGCTTTTCATCGATAACACGACGT  
 AAGGTCTGCGGGCGTGCAAGACGGCTCTATGCAGGCGATTTCGGATTGTCTGGGTGCTAAC  
 TCTGATCCCAGGTGCCTGCTGAAGTTGATGCTGGATCTGTGTGGCATTGAGATGGCGATT  
 CTTAGGACTGTGGAGATGATGAATCGATCTTGACTTATGGTGGTGACATTAGGACGTCGGG  
 TTCGTGTCTTATCCTGCACTCTTCCAGTTGTTTCGGTGACGCTCTGGTACCCGGCTGATTAC  
 TGACTGAGATATCCATCTGCCGTGCGACATGAGCCTGTGTTGGCCAGCCTGAAGCATTTG  
 CAATCGCCAGAGACGCTCTTCAAAAGTCATTTCGACGCATGGcTTTCTGTTCACAAATGACA  
 GCGTAAAACAGcTTTTTGGcGCTTTTATGCTTCCCAAGAGCATGAAAAACACGTTCTATgGG  
 TCGcGCACACCTTACATGACAAGcGtGAAAAGTGACTTGcACCCCTTGTcGtGTTTCGGATG  
 CACACTCTGTTTACGTACTGATGCGATTTGGCGTCTAAACATGTTTTTGGCGTCTAAACATG  
 TTTTCCTGCATGATTTCATATACTATTTTGTTCATATTCCTGGCATCAAACCAAACACTACAGTG  
 AAATATATTTTCAATATCCCCTACTTTGTGTGAGTAGTATAGATCACTGCAGACAACATATA



27/29

GACAAAtGCAGtTaCaCCGTCAACAATCCCAGTCATTAATTATGATGaCaCTTCCACACATA  
GfGTcAGTGATTGTAAATTCAaCTGTACACACTTTTCCCCTGAACATTcAGGATCTATATGA  
CTAAATATATAACATTAGTATACGTGCAGTTTTGTATCGCTACGACATTGTTGTAACCTCTT  
TGTTTTAATCATTTaACAG

Domäne c

CTGATGCCAAAGaCTTTGgCCATAGCAGAAAAATCAGgAAAGcCGTTGATTcTcTGACAGT  
CgAAGAACAaaCTTCGTTGAGgCGAGcTATGgCAGATcTACAGGACGACAAAAACATCAGGG  
GGTTTTCCAGCAGATTGCAGCATTCACGGAGAACCaaaATGGTGTCCAAGCCCCgAAGCGG  
AGAAAAAATTTGCATGCTGTGTTTCATGGAATGGCTGTTTTCCCTCACTGGCACAGATTGCT  
GACAGTTCAAGGAGAAAAATGCTCTGAGGAAACATGGCTTTACTGGTGGACTGCCCTACTGG  
GACTGGACTCGATCAATGAGCGCCCTTCCACATTTTGTGCTGATCCTACTTACAATGATG  
CTATTTCCAGCCAGGAAGAAGATPACCCATGGCATCATGGTCACTAGACTCTGTTGGGCA  
TGATACTACAAGAGATGTGCGTGATGATCTTTATCAATCTCCTGGTTTCGGTCACTACACA  
GATATTGCACAACAAGTCTTCTGGCCCTTTGAGCAGGACAGTTTCTGTGATTTTGAGGTAC  
AATTTGAAATTGCCCATAAATTTTATACATGCACTGATTGGTGGTAACGAACCATAACAGTAT  
GTCATCTTTGAGGTATACTACATACGATCCAATCTTCTTCTTGCACCACTCCAGTACAGAC  
CGACTTTGGGCCATCTGGCAAGCAATCACTAGTGCGGCCGCCCTGCAGGTGACCATAAAGG  
AGAGCTCCCAACGCgtTGGAAtGCAATCT

Domäne g

ATGGCTGTGTTTTCCGCACTGGCACAGACTGTTTGTGAAACAGATGGAGGACGCACCTTGCTG  
CTCATGGAGCTCATATTGGCATACCATACTGGGATTGGACAAGTGCGTTTTAGTCATCTGCC  
CGCCCTAGTGACTGACCACGAGAACAATCCCTTCCACCAC

Intron g(2)

GTATGTGTCAAATCGTTTTAGGAACTGCCTTATCCATTTTACAATTACGAGTACAAAATGA  
AAACGGAAACTGTGTGACCTCGAAAAGTGCAATCTTTAAAGGATGCAATGTACACAATAAA  
ATGCTCCGATCAAAAGCGATGGCTAGAAATCATTTTTCCCTCTAATTCCCTTTCACACAGCT  
CGGTTTCGTTTTAAGTAGGAACAAGTCTCTGCAAAAACATCACAAATAAAGAGAACACAGAA  
AAAACCTCATTTCTCGTTTTCTGTATTCCGAAAATGAAATTTACAATTTCTTTTCAATTTATAG

Domäne g

GGCCATATTGGTCATCTGAATGTGGATACATCTCGATCTCCAAGAGACATGCTGTTTAATG  
ATCCTGAACAAGGCTCAGAATCATTTCTCTACAGACAGGTTCTCTTGACTCTAGAACAGAC  
AGACTTCTGCCAATTTGAAGTTCAGTTTGAACCTTACACACAATGCCATCCACTCTTGGACT  
GGAGGACATACTCCATATGGAATGTCATCACTGGAATATACAGCATATGATCCACTCTTTT  
ATCTCCACCATTCCAACACTGATCGTATCTGGGCCATCTGGCAGGCACTCCAGAPATATAG  
AGGTCTTCCATACAPACGAGCTCACTGCGATATccaagttctgaaacaacctcTTAAACCA  
TTCAGCGAGTCCAGGAATCCAAACCCAGTCACCAGAGCCAATTCTAGGGCCGTTGATTCAT  
TTGATTATGAGAAATTCAATTATCAATATGACACACTTACCTTCCACGGACTTTCTATCCC  
AGAACTTGATGCCATGCTTCAAGAGAGAAAGAAGGAAGAGAGAACATTTGCAGCCTTCCTG  
TTGCACGGATTTGGCGCCAGTGCTGATGTTTTCGTTTGATGTCTGCACACCTGATGGTCATT  
GTGCCTTTGCTGGAACCTTCGCGGTACTTGGTGGGGAGCTTGAGATGCCCTGGTCCCTTTGA  
AAGATTGTTCCGTTACGATATCACAAAGGTTCTCAAGCAGATGAATCTTCACTATGATTCT  
GAGTTCCACTTTGAGTTGAAGATTGTTGGCACAGATGGAAACAGAACTGCCATCGGATCGTA  
TCAAGAGCCCTACCATTGAACACCATGGAGGAG



## Intron g/h

GTATGTTTTGAGATCCACATAATCTTCTACCCTGTCTCATTTCTAATGCTCTTCAATACAC  
AATTTATATAGCCTTTGAGCTTCAGATGTATTACGGACAGGCATTACAGTATACATGTAAT  
ATGGTTTTCTGCTATTTGCAAAAATTGTGTCCTATCTCTGTTTCAGATCATCATGGCGGTGA  
CACCTAG

## Domäne h

GTCACGATCACAGTGAACGTCACGATGGATTTTTTCAGGAAGGAAGTCGGTTCCCTGTCCCT  
GGATGAAGCCAATGACCTTAAAAATGCACTGTACAAGCTGCAGAATGATCAGGGTCCCAAT  
GGATATGAATCAATAGCCGGTTACCATGGCTATCCATTCCTCTGCCCTGAACATGGTGAAG  
ACCAGTACGCATGCTGTGTCCACGGAATGCCTGTATTTCCACATTGGCACAGACTTCATAC  
AATCCAGTTTGAGAGAGCTCTCAAAGAACATGGTTCTCATTTGGGTCTGCCATACTGGGAC  
TGGAC



29/29

Figur 11

Abgeleitete Primärstruktur von KLH2

## Domäne b

GLPYWDWTMPMSHLP ELATSETYLD PVTGETKNNPFHHAQVAFENGVT SRNPD AKLFMKPT  
YGDHTYLFDSMIYAFEQEDFCDFEVQYELTHNAI HAWVGGSEKYSMSSLHYTAFDPIFY LH  
HSNVDRLWAIWQALQIRRGKSYKAHCASSQEREPLKPTAFSSPLNNNEKTYHNSVPTNVYD  
YVGVLHYRYDDLQFGGMTMSELEEYIHKQTQHDRTFAGFFLSYIGTSASVDIFINREGHDK  
YKVGSFVVLGGSKEMKWGFDRMYKYEITEALKTLNVAVDDGFSITVEITD VDGSPPSADLI  
PPPAIIFERGHA

## Domäne c

DAKDFGHSRKIRKA VDSLTVEEQTS LR RAMADLODDKTS GGFQQIAAFHGEPKWCP SPEAE  
KKFACCVHGM AVFPHWHRLTVQGENALRKHGFTGGLPYWDWTRSMSALPHFVADPTYNDA  
ISSQEEDNPWHHGHIDSVGHDTTRDVRDDL YQSPGFGEHYTDIAQQVLLAFEQDSFCDFEVQ  
FEIAHNFIAHALIGGNEPYSMSSLRYTTYDPIFFLHHSSTDRLWAIWQALQKYRGKPYNTAN  
CAIASMRKPLQPFGLDSVINPDDETREHSVPFRVFDYKNNFDYEYESLAFNGLSIAQLDRE  
LQRRKSHDRVFAGFLLHEIGOSAKHNVS DCDHYAGEFYILGDEAEMPWRYDRVYKYEITQQ  
LHDLDLHVGDNFFLKYEAFDLN GGS LGGSI FSQPSVIFEP AAGMF

## Domäne d

GSHQADEYREAVTSASHIRKNIRD LSEGEIESIRSAFLQIQKEGIYENIAKFHGKPGLCER  
DGHPVACCVHGMPTFPHWHRLYVLQVENALLERGS AVAVPYWDWTLPR

## Domäne e

MAVFPWHRL FVKQMEDALAAHGAHIGIPYWDWTSAPSHLPALVTDHENNPFHHGHIGHLN  
VDTSRSPRDMLENDPEQGSSEFFYRQVLLTLEQTDFCQFEVQFELTHNAIHSWTGGHTPYG  
MSSLEYTAYDPLFY LHHSNTDRIWAIWQALQKYRGLPYNAHCDIQVLKQPLKPFSES RNP  
NPVTRANSRAVDSFDYEKFNYQYDTLTFHGLSIPELDAMLQERKKEERTFAAFL LHGFGAS  
ADV SFDVCTPDGHCAFAGTFAVLGGELEMPWSFERLFRYDITKVLKQMN LHYDSEFHFELK  
IVGTDGTELP SDRIKSPTIEHHGC

## Domäne f

GHDHSE RHDGFFRKEVGSLSLDEANDLKNALYKLQNDQGPNGYESIAGYRGYPFLCPEHGE  
DQYACCVHGM PVFPHWHRLHTIQFERALKEHGS HLGLPYWDW





(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



9/936852

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. September 2000 (21.09.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/55192 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/00,  
A61K 39/00, C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02410

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. März 2000 (17.03.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 11 971.6 17. März 1999 (17.03.1999) DE  
199 39 578.0 20. August 1999 (20.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE];  
Schorndorfer Strasse 32, D-70734 Fellbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MARKL, Jürgen

[DE/DE]: An der Mahlsteig 12, D-55296 Gau-Bischofsheim (DE). ALTENHEIN, Benjamin [DE/DE]; Elsässer Platz 7, D-65195 Wiesbaden (DE). LIEB, Bernhard [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Strasse 27, D-55129 Mainz (DE). STIEFEL, Thomas [DE/DE]; Steinkopfstrasse 22, D-70184 Stuttgart (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HEMOCYANIN AND NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR THE SAME

(54) Bezeichnung: HÄMOCYANIN UND DAFÜR KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence coding for a hemocyanin, a hemocyanin domain or a fragment having the immunological properties of at least one hemocyanin domain. The invention also relates to constructs containing the nucleic acid molecule and possibly a promoter suitable for controlling expression. According to a preferred embodiment the construct also contains a nucleic acid sequence coding for an antigen. The invention also relates to host cells containing the above nucleic acid molecules and/or constructs, to the recombinant expression of the nucleic acid molecules and/or constructs in the host cells, as well as to hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment having the immunological properties of at least one hemocyanin domain and hemocyanin fusion proteins which are coded for by the nucleic acid molecules and/or constructs. The invention also relates to pharmaceutical preparations containing the nucleic acid molecules and/or hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, and to liposomes containing the nucleic acid molecules and/or hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein. Finally the invention relates to antibodies which can be obtained by immunization of an experimental animal with the hemocyanin, a hemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, as well to their use in screening methods for identifying tumors.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Konstrukte, die das Nukleinsäuremolekül und gegebenenfalls einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Konstrukt ferner eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz. Die Erfindung betrifft ausserdem Wirtszellen, die diese Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die rekombinante Expression der Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte in den Wirtszellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin und Hämocyanin-Fusionsproteine, die von den Nukleinsäuremolekülen und/oder Konstrukten kodiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung Liposomen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Hämocyanin, einer Hämocyanin-Domäne, einem Fragment davon oder einem Fusionsprotein, erhältlich sind, und deren Verwendung in Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumoren.

WO 00/55192 A3



europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

18. April 2002

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02410

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/00 A61K39/00 C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 621 039 A (AKZO NOBEL NV) 26 October 1994 (1994-10-26) the whole document ---	1-44
A	EP 0 252 829 A (PASTEUR INSTITUT ;PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED ()) 13 January 1988 (1988-01-13) the whole document ---	1-44
X,P	US 5 888 775 A (CHAVAILLAZ PIERRE-ANDRE ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) abstract column 8, line 45 - line 59 ---	1-44
A	EP 0 244 295 A (PASTEUR INSTITUT ;PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED ()) 4 November 1987 (1987-11-04) the whole document ---	1-44
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2001

Date of mailing of the international search report

13.7.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT, EP 00/02410

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 11019 A (ZONAGEN INC) 26 May 1994 (1994-05-26) the whole document ---	1-44
X	US 5 831 033 A (BAO LERE ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 7, line 56 -column 17, line 47 ---	1-44
X	SWERDLOW RICHARD D ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, vol. 113, no. 3, 1996, pages 537-548, XP000900921 ISSN: 0305-0491 the whole document ---	1-44
A	HAMILTON J V ET AL: "Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic Schistosoma mansoni egg antigens." PARASITOLOGY, vol. 118, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 83-89, XP000912289 ISSN: 0031-1820 the whole document ---	1-44
A	MILLER KAREN I ET AL: "Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 278, no. 4, 15 May 1998 (1998-05-15), pages 827-842, XP002164204 ISSN: 0022-2836 the whole document ---	1-44
X,P	STOEVA STANKA ET AL: "Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1435, no. 1-2, 16 November 1999 (1999-11-16), pages 94-109, XP000937695 ISSN: 0006-3002 the whole document In particular paragraphs 2.6, 3.1, table 1, Figures 1, 3 --- -/--	1-44

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

X,P

GEBAUER WOLFGANG ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): Detection and immunolocalization of a labile functional unit h."  
JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY.,  
vol. 128, no. 3,  
30 December 1999 (1999-12-30), pages  
280-286, XP000937601  
ISSN: 1047-8477  
the whole document  
In particular table 1

1-44

A

HARRIS J ROBIN ET AL: "Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (Megathura crenulata): A parallel subunit model."  
JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY,  
vol. 111, no. 2, 1993, pages 96-104,  
XP000900919  
ISSN: 1047-8477  
the whole document

1-44

T

CARRERA M ROCIO A ET AL: "Cocaine vaccines: Antibody protection against relapse in a rat model."  
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES,  
vol. 97, no. 11, 23 May 2000 (2000-05-23),  
pages 6202-6206, XP002148844  
May 23, 2000  
ISSN: 0027-8424  
the whole document

38

X

SOEHNGEN SABINE M ET AL: "Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)."  
EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,  
vol. 248, no. 2, 1997, pages 602-614,  
XP000912288  
ISSN: 0014-2956  
cited in the application  
the whole document  
In particular table 3

1-44

X

CARRERA M ROCIO A ET AL: "Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization."  
NATURE (LONDON),  
vol. 378, no. 6558, 1995, pages 727-730,  
XP000946580  
ISSN: 0028-0836  
the whole document

38

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT, EP 00/02410

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LIEB BERNHARD ET AL: "The sequence of a gastropod hemocyanin (Hth1 from Haliotis tuberculata)." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 8, 25 February 2000 (2000-02-25), pages 5675-5681, XP000946778 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-44
X,P	--- LIEB BERNHARD ET AL: "Subunit organization of the abalone Haliotis tuberculata hemocyanin type 2 (Hth2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 265, no. 1, October 1999 (1999-10), pages 134-144, XP000952187 ISSN: 0014-2956 the whole document	1-44
X,P	--- KELLER HENNING ET AL: "Abalone (Haliotis tuberculata) hemocyanin type 1 (Hth1): Organization of the approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 264, no. 1, August 1999 (1999-08), pages 27-38, XP000952186 ISSN: 0014-2956 the whole document -----	1-44

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP00/02410

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claim nos.: 1-44 partially

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 1. Claim nos.: 1-44 (partially)

Nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence which codes for a hemocyanin domain or a functional fragment thereof with the immunological characteristics of at least one domain of a hemocyanin, comprising a sequence that is selected from SEQ ID Nos. 1-8 of the sequence list, and hemocyanin polypeptide, comprising an amino acid sequence that is selected from SEQ ID nos. 25-32 of the sequence list. Pharmaceutical compounds containing the hemocyanin domain above and their uses in therapeutic treatments for tumour-related diseases, infections, cocaine abuse.

## 2. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 9-15; aa SEQ ID Nos. 33-39.

The inventions listed below are with the relative nucleic acid (DNA) and amino acid sequences (aa).

## 3. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 16-19; aa SEQ ID Nos. 40-43.

## 4. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 20-24; aa SEQ ID Nos. 44-48.

## 5. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID No. 49; aa SEQ ID No. 63.

## 6. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID No. 50; aa SEQ ID No. 65.

## 7. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 51-53; aa SEQ ID No. 66-68.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

EP00/02410

8. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: aa SEQ ID No. 69.

9. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 54-56; aa SEQ ID Nos. 70-72.

10. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: aa SEQ ID No. 73.

11. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 57-62; aa SEQ ID Nos. 74-79.

12. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 80-87

13. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 88-95

14. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 96-101

15. Claim nos.: 1-44 (partially)

As for invention 1, related to sequences such as the following: DNA SEQ ID Nos. 102-108

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT, \_P 00/02410

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0621039	A	26-10-1994	US 5407912 A	18-04-1995
			AU 681872 B	11-09-1997
			AU 6051994 A	20-10-1994
			CA 2121296 A	20-10-1994
			FI 941725 A	20-10-1994
			JP 7101875 A	18-04-1995
			US 5981476 A	09-11-1999
			US 5855919 A	05-01-1999
-----				
EP 0252829	A	13-01-1988	FR 2601021 A	08-01-1988
			AU 7528087 A	08-12-1988
			DK 347987 A	08-01-1988
			JP 1139533 A	01-06-1989
			OA 8630 A	30-11-1988
			PT 85278 A,B	01-08-1987
			US 5021560 A	04-06-1991
			ZA 8704920 A	27-04-1988
-----				
US 5888775	A	30-03-1999	AT 171217 T	15-10-1998
			AU 696349 B	10-09-1998
			AU 2371195 A	29-11-1995
			CA 2165413 A	30-10-1995
			DE 69504795 D	22-10-1998
			DE 69504795 T	12-05-1999
			EP 0706574 A	17-04-1996
			JP 8512210 T	24-12-1996
			WO 9530016 A	09-11-1995
			US 5763284 A	09-06-1998
-----				
EP 0244295	A	04-11-1987	FR 2598147 A	06-11-1987
			AU 7185387 A	05-11-1987
			DE 244295 T	13-10-1988
			DK 219787 A	31-10-1987
			JP 63039888 A	20-02-1988
			PT 84788 A,B	01-05-1987
-----				
WO 9411019	A	26-05-1994	CN 1110177 A	18-10-1995
			AU 675269 B	30-01-1997
			AU 5680094 A	08-06-1994
			CA 2127531 A	26-05-1994
			EP 0634936 A	25-01-1995
			JP 7503142 T	06-04-1995
			US 6027727 A	22-02-2000
			US 6001599 A	14-12-1999
			US 5989550 A	23-11-1999
			US 5976545 A	02-11-1999
			US 5981228 A	09-11-1999
			US 5837497 A	17-11-1998
-----				
US 5831033	A	03-11-1998	US 5721337 A	24-02-1998
			US 6017717 A	25-01-2000

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02410

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07K14/00 A61K39/00 C12N15/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 621 039 A (AKZO NOBEL NV) 26. Oktober 1994 (1994-10-26) das ganze Dokument	1-44
A	EP 0 252 829 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED ( ) 13. Januar 1988 (1988-01-13) das ganze Dokument	1-44
X, P	US 5 888 775 A (CHAVAILLAZ PIERRE-ANDRE ET AL) 30. März 1999 (1999-03-30) Zusammenfassung Spalte 8, Zeile 45 - Zeile 59	1-44
A	EP 0 244 295 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED ( ) 4. November 1987 (1987-11-04) das ganze Dokument	1-44
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetüht)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. 7. 01

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, T.x. 31 551 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Panzica, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
-----------	--	---------------------

X	WO 94 11019 A (ZONAGEN INC) 26. Mai 1994 (1994-05-26) das ganze Dokument ---	1-44
X	US 5 831 033 A (BAO LERE ET AL) 3. November 1998 (1998-11-03) Spalte 7, Zeile 56 -Spalte 17, Zeile 47 ---	1-44
X	SWERDLOW RICHARD D ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, Bd. 113, Nr. 3, 1996, Seiten 537-548, XP000900921 ISSN: 0305-0491 das ganze Dokument ---	1-44
A	HAMILTON J V ET AL: "Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic Schistosoma mansoni egg antigens." PARASITOLOGY, Bd. 118, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 83-89, XP000912289 ISSN: 0031-1820 das ganze Dokument ---	1-44
A	MILLER KAREN I ET AL: "Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 278, Nr. 4, 15. Mai 1998 (1998-05-15), Seiten 827-842, XP002164204 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument ---	1-44
X,P	STOEVA STANKA ET AL: "Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1435, Nr. 1-2, 16. November 1999 (1999-11-16), Seiten 94-109, XP000937695 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument insbesondere Absätze 2.6, 3.1, Tabelle 1, Abbildungen 1, 3. ---	1-44

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X,P	<p>GEBAUER WOLFGANG ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): Detection and immunolocalization of a labile functional unit h."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY., Bd. 128, Nr. 3, 30. Dezember 1999 (1999-12-30), Seiten 280-286, XP000937601 ISSN: 1047-8477 das ganze Dokument insbesondere Tabelle 1.</p> <p>---</p>	1-44
A	<p>HARRIS J ROBIN ET AL: "Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (Megathura crenulata): A parallel subunit model."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 111, Nr. 2, 1993, Seiten 96-104, XP000900919 ISSN: 1047-8477 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-44
T	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Cocaine vaccines: Antibody protection against relapse in a rat model."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 97, Nr. 11, 23. Mai 2000 (2000-05-23), Seiten 6202-6206, XP002148844 May 23, 2000 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	38
X	<p>SOEHNGEN SABINE M ET AL: "Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 248, Nr. 2, 1997, Seiten 602-614, XP000912288 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument Insbesondere Tab.3.</p> <p>---</p>	1-44
X	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization."</p> <p>NATURE (LONDON), Bd. 378, Nr. 6558, 1995, Seiten 727-730, XP000946580 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	38

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X,P	<p>LIEB BERNHARD ET AL: "The sequence of a gastropod hemocyanin (Hth1 from Haliotis tuberculata)."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 275, Nr. 8, 25. Februar 2000 (2000-02-25), Seiten 5675-5681, XP000946778 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-44
X,P	<p>LIEB BERNHARD ET AL: "Subunit organization of the abalone Haliotis tuberculata hemocyanin type 2 (Hth2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 1, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 134-144, XP000952187 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-44
X,P	<p>KELLER HENNING ET AL: "Abalone (Haliotis tuberculata) hemocyanin type 1 (Hth1): Organization of the approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 1, August 1999 (1999-08), Seiten 27-38, XP000952186 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-44

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/02410

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-44 teilweise

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 1. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften von wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz die aus Seq.Id.No.1-8 des Sequenzverzeichnisses ausgewählt ist, und Hämocyanin-polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die aus Seq.Id.No.25-32 des Sequenzverzeichnisses ausgewählt ist. Pharmazeutische Zusammensetzungen die den obigen Hämocyanindomäne enthalten, sowie deren Verwendungen in therapeutische Behandlungen gegen geschwulstverwandten Krankheiten, Infektionen, Kokain-Missbrauch.

## 2. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos. 9-15; aa Seq.Id.Nos.33-39.

Die folgend gelistete Erfindungen sind mit den bezüglichen Nukleinsäure- (DNA) und Aminosäuresequenzen (aa).

## 3. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.16-19; aa. SeqId.Nos.40-43.

## 4. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.20-24; aa Seq.Id.Nos.44-48.

## 5. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:DNA Seq.Id.No.49; aa Seq.Id.No.63.

## 6. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.No.50; aa Seq.Id.No.65.

## 7. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.51-53; aa Seq.Id.Nos.66-68.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 8. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
aa Seq.Id.No. 69.

## 9. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.54-56; aa Seq.Id.Nos.70-72.

## 10. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
aa Seq.Id.No. 73.

## 11. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.57-62; aa Seq.id.Nos.74-79.

## 12. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos. 80-87.

## 13. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.88-95.

## 14. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos.96-101.

## 15. Ansprüche: 1-44 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Sequenzen wie Folgendes:  
DNA Seq.Id.Nos. 102-108.

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zur Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02410

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0621039 A	26-10-1994	US 5407912 A	18-04-1995
		AU 681872 B	11-09-1997
		AU 6051994 A	20-10-1994
		CA 2121296 A	20-10-1994
		FI 941725 A	20-10-1994
		JP 7101875 A	18-04-1995
		US 5981476 A	09-11-1999
		US 5855919 A	05-01-1999
EP 0252829 A	13-01-1988	FR 2601021 A	08-01-1988
		AU 7528087 A	08-12-1988
		DK 347987 A	08-01-1988
		JP 1139533 A	01-06-1989
		OA 8630 A	30-11-1988
		PT 85278 A,B	01-08-1987
		US 5021560 A	04-06-1991
		ZA 8704920 A	27-04-1988
US 5888775 A	30-03-1999	AT 171217 T	15-10-1998
		AU 696349 B	10-09-1998
		AU 2371195 A	29-11-1995
		CA 2165413 A	30-10-1995
		DE 69504795 D	22-10-1998
		DE 69504795 T	12-05-1999
		EP 0706574 A	17-04-1996
		JP 8512210 T	24-12-1996
		WO 9530016 A	09-11-1995
		US 5763284 A	09-06-1998
EP 0244295 A	04-11-1987	FR 2598147 A	06-11-1987
		AU 7185387 A	05-11-1987
		DE 244295 T	13-10-1988
		DK 219787 A	31-10-1987
		JP 63039888 A	20-02-1988
		PT 84788 A,B	01-05-1987
WO 9411019 A	26-05-1994	CN 1110177 A	18-10-1995
		AU 675269 B	30-01-1997
		AU 5680094 A	08-06-1994
		CA 2127531 A	26-05-1994
		EP 0634936 A	25-01-1995
		JP 7503142 T	06-04-1995
		US 6027727 A	22-02-2000
		US 6001599 A	14-12-1999
		US 5989550 A	23-11-1999
		US 5976545 A	02-11-1999
		US 5981228 A	09-11-1999
		US 5837497 A	17-11-1998
US 5831033 A	03-11-1998	US 5721337 A	24-02-1998
		US 6017717 A	25-01-2000